

**Aus der Klinik für Gynäkologie, gynäkologische Endokrinologie und
Onkologie**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Uwe Wagner

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Synergistische Effekte von Celecoxib und Flavopiridol beim
humanen Ovarialkarzinom in vitro**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stefanie Klingebiel aus Bonn

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 19. Mai 2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. U. Wagner

1. Korreferent: PD Dr. M. Ritter

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung	7
1.1) Das Ovarialkarzinom	7
1.2) Vorstellung der Medikamente	9
1.2.1) Celecoxib	9
1.2.1.1) Geschichte, Risiken	9
1.2.1.2) Strukturformel und Erläuterungen zu COX-1 und COX-2	10
1.2.1.3) Mögliche antikarzinogene Wirkmechanismen von Celecoxib	11
1.2.1.4) Effekte von Celecoxib in der Behandlung des Ovarialkarzinoms	13
1.2.1.5) Klinische Studien mit Celecoxib in der Krebstherapie	14
1.2.2) Flavopiridol	15
1.2.2.1) Allgemeines	15
1.2.2.2) Wirkmechanismen von Flavopiridol	16
1.2.2.3) Effekte von Flavopiridol in der Behandlung des Ovarialkarzinoms	17
1.2.2.4) Klinische Studien mit Flavopiridol bis zum heutigen Tag	18
1.3) Synergismus und Synergismus-Theorie	20
1.3.1) Definition und Erläuterung	20
1.3.2) Mathematisches Modell zur Beurteilung von synergistischen Effekten in der Pharmakologie	21
1.3.3) Begründung für die Auswahl von Celecoxib und Flavopiridol als Versuchspartner	22
1.4) Vorstellung der nachzuweisenden Proteine	23
1.4.1) PKB/Akt	23
1.4.1.1) Aufbau, Struktur, Signalweg, Aktivierung	23
1.4.1.2) Zelluläre Funktionen von AKT und die Bedeutung für humane Karzinome	24
1.4.2) Die RAS-Proteine	25
1.4.2.1) Bedeutung, Funktion und Struktur	25
1.4.2.2) RAS-Effektoren und die wichtigsten Signalkaskaden	26
1.5) Zielsetzung der Arbeit	27
2) Material und Methoden	28
2.1) Material	28
2.1.1) Biologisches Material	28
2.1.2) Chemikalien, Enzyme, Antikörper	28
2.1.3) Kits	30
2.1.4) Kulturmedien, Lösungen, Ansätze	30
2.1.5) Verbrauchsmaterial	32

2.1.6) Geräte, Software.....	33
2.2) Methoden	35
2.2.1) Zellkultur, Anfärbung der Zellen, Proliferationsassays	35
2.2.2) Versuch zur Zeitabhängigkeit der Medikamentenwirkung	37
2.2.3) Konzentrationsversuche	38
2.2.4) Synergismus-Versuche.....	39
2.2.5) Zellzyklusanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie	42
2.2.6) Unterscheidung Apoptose / Nekrose mit dem Annexinversuch	44
2.2.7) Western Blots	46
3) Ergebnisse	51
3.1) Anfärbung der Zellen mit Kristallviolett.....	51
3.2) Zeitabhängigkeit der Medikamentenwirkung	52
3.2.1) Zeitabhängigkeit der Wirkung von Flavopiridol.....	52
3.2.2) Zeitabhängigkeit der Wirkung von Celecoxib	54
3.3) Konzentrationsversuche	57
3.3.1) Austestung der Konzentrationen von Flavopiridol	57
3.3.2) Austestung der Konzentrationen von Celecoxib.....	59
3.4) Synergismus – Versuche	62
3.4.1) für BG-1-Zellen.....	62
3.4.2) für SKOV-3-Zellen	68
3.5) Zellzyklusanalyse.....	74
3.6) Annexin-Versuch	77
3.7) Western Blots.....	81
3.7.1) Kontroll-Blot mit Anti- β -Aktin-Antikörper	81
3.7.2) Western Blot mit Anti-pan-RAS-Antikörper	82
3.7.3) Western Blot mit Anti-AKT-Antikörper.....	85
4) Diskussion.....	87
4.1) Diskussion der Ergebnisse	87
4.1.1) Färbung der Zellen mit Kristallviolett.....	87
4.1.2) Vergleich der Zeitabhängigkeiten bezüglich der Proliferationshemmung.....	87
4.1.3) Vergleich der Proliferationshemmung bzw. der IC_{50} -Werte mit der Literatur.....	87
4.1.4) Interpretation der Proliferationshemmung in den Kombinationsversuchen.....	91
Für BG-1-Zellen:	91
Für SKOV-3-Zellen.....	91
4.1.5) Vergleich der FACS-Analysen	92
4.1.6) Interpretation der Annexin-Analyse auf Basis der FACS-Ergebnisse	96

4.1.7) Western Blotting	100
4.1.7.1) AKT	100
4.1.7.2) RAS.....	103
4.2) Auswahl der Substanzen	105
4.2.1) Celecoxib	105
4.2.2) Flavopiridol.....	109
4.3) Mögliche molekulare Schnittstellen beider Medikamente.....	113
4.4) Ausblick:	114
5) Zusammenfassung.....	115
6) Literaturverzeichnis	117
7) Anhang	134
Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren	1344
Danksagung	1355

1) Einleitung

1.1) Das Ovarialkarzinom

Epidemiologie (122)

Nach den aktuellen Ergebnissen der Schätzung des Robert-Koch-Instituts, die auf den Daten des Krebsregisters bis 2006 basieren, treten jährlich bei ca. 9.670 Frauen in Deutschland Krebserkrankungen der Eierstöcke auf. Dies entspricht 4,9% aller bösartigen Neubildungen bei Frauen. Die Sterblichkeit ist mit nahezu 5.500 Fällen pro Jahr (5,6% aller Krebssterbefälle) aufgrund der schlechten Prognose sehr hoch.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 67 und 68 Jahren. Etwa 5- 10% aller Ovarialkrebsfälle, zumeist vom Typ des Keimzelltumors, treten allerdings bereits unter 45 Jahren auf.

Im internationalen Vergleich der Neuerkrankungsraten liegt Deutschland im oberen Mittelfeld. Am häufigsten findet man Neuerkrankungen in England, am seltensten in Australien (121).

Die Überlebensaussichten für Patientinnen mit Eierstockkrebs sind im Vergleich zu denen mit anderen Krebserkrankungen der weiblichen Geschlechtsorgane schlecht.

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit zwischen 35-49% in Deutschland.

Die Erkrankungsraten an Ovarialkrebs haben von 1980 bis 2006 um 10% zugenommen, seit 1990 sind fast ausschließlich die Erkrankungsraten der über 70-jährigen Frauen angestiegen. Dagegen sind die Mortalitätsraten um 30% zurückgegangen, besonders für Frauen unter 60 Jahren (122).

Durch das Fehlen effizienter Verfahren zur Früherkennung wird das Ovarial-Karzinom oft erst in weit fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Ein generelles Screening für das Ovarialkarzinom kann zurzeit nicht empfohlen werden (1), (129).

Allgemeine Informationen (1)

Die **histologische Klassifikation** erfolgt gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation von 2003 (165).

Es gibt sowohl eine TNM-Klassifikation als auch eine Stadien-Einteilung nach FIGO. Hier erfolgt lediglich eine verkürzte Vorstellung der FIGO-Stadien (1):

FIGO 1: Der Tumor ist begrenzt auf die Ovarien.

FIGO 2: Der Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus.

FIGO 3: Der Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit histologisch nachgewiesenen Peritoneal-Metastasen außerhalb des Beckens und / oder regionären Lymphknotenmetastasen.

FIGO 4: Fernmetastasen (Peritoneal-Metastasen werden nicht zu den Fernmetastasen gezählt).

Die **Prognose** des Ovarialkarzinoms ist schlecht, da der Tumor im kleinen Becken zunächst ungehindert und unbemerkt wachsen kann, so dass er meist erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt wird.

Etablierte Prognose-Faktoren sind Tumorstadium, postoperativer Tumorrest, Alter, Allgemeinzustand, histologischer Typ und Tumor-Grading (1).

Die systematische chirurgische Exploration ist von entscheidender Bedeutung für die Festlegung des Tumorstadiums und das weitere Procedere (168), (21), (99).

Die **Therapie** erfolgt zunächst operativ. Danach schließt sich meist eine Chemotherapie an.

Patientinnen mit epithelalem Ovarialkarzinom im Stadium IA, Grad 1 benötigen keine adjuvante Chemotherapie.

Patientinnen mit **Stadium I-II** eines epithelialen Ovarialkarzinoms benötigen eine platinhaltige **adjuvante Chemotherapie**, die aus drei bis sechs Zyklen besteht. Diese reduziert das Risiko für ein Rezidiv und verbessert die Gesamtüberlebensrate.

Patientinnen mit fortgeschrittenem epithelialen Ovarialkarzinom (**FIGO IIB-IV**) erhalten eine **primäre Chemotherapie**.

Nach der zytoreduktiven Operation wird eine standardisierte Chemotherapie aus Carboplatin (AUC5) und Paclitaxel, bestehend aus insgesamt sechs Zyklen, verabreicht. Es gibt derzeit keine Daten für eine Therapieverlängerung über sechs Zyklen, für Dosis-Eskalationen oder für die Addition weiterer Medikamente außerhalb klinischer Studien (1).

1.2) Vorstellung der Medikamente

1.2.1) Celecoxib

1.2.1.1) Geschichte, Risiken

Celecoxib war der erste in den USA zugelassene selektive COX-2-Hemmer (1998).

Ursprünglich wurde er entwickelt für die Behandlung von chronischen Entzündungskrankheiten und zur Bekämpfung der damit verbundenen Schmerzen (74).

Die Strukturformel des Medikamentes wurde am Computer entwickelt.

Die Vermutung, dass viele der unerwünschten Nebenwirkungen der nicht-selektiven COX-Hemmer (Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Diclofenac) auf die Hemmung der COX-1 zurückzuführen seien, stellte die Motivation für die Entwicklung selektiver COX-2-Hemmer dar, als eine neue Klasse anti-inflammatorischer und analgetischer Wirkstoffe mit deutlich verbesserter gastrointestinaler Verträglichkeit (88).

Das Medikament wurde zunächst erfolgreich etabliert (45).

Zurzeit wird der Einsatz von selektiven COX-2-Inhibitoren jedoch sehr kritisch betrachtet. In mehreren Studien zur Langzeiteinnahme dieser Medikamente stellte man fest, dass das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (wie Blutdruckanstieg, Schlaganfall, Myokardinfarkt) deutlich zunimmt.

Die kardiovaskulären Nebenwirkungen veranlassten Merck dazu, Rofecoxib im September 2004 vom Markt zu nehmen, und sie führten dazu, dass die FDA (Food and Drug Administration) die Firma Pfizer im April 2005 dazu aufforderte, Valdecoxib vom Markt zu nehmen (52).

Die Studienlage bezüglich der kardiovaskulären Nebenwirkungen von Celecoxib ist widersprüchlich, es darf aber bei folgenden Indikationen in Deutschland verschrieben werden: Celecoxib ist in Deutschland in den Wirkstärken 100mg und 200mg für die Behandlung von Symptomen bei Reizzuständen degenerativer Gelenkerkrankungen (aktivierte Arthrosen) oder chronischer Polyarthritits (rheumatoide Arthritis) zugelassen. Die Einnahme erfolgt – abhängig von der Indikation – ein- bis zweimal täglich (20).

1.2.1.2) Strukturformel und Erläuterungen zu COX-1 und COX-2

Anstelle der Carboxylgruppe der klassischen NSAR enthält die Strukturformel von Celecoxib eine Sulfonamidgruppe. Der schwefelhaltige Phenylring von Celecoxib bindet an eine offene katalytische Seitentasche der COX-2, aber interagiert nur schwach mit der aktiven Bindungsstelle der COX-1.

Deswegen ist Celecoxib ein starker Hemmer der COX-2 aber nicht der COX-1 (18), (73).

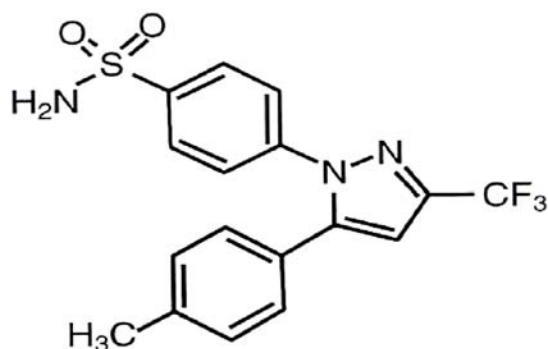


Abbildung 1: Strukturformel von Celecoxib (78)

Summenformel: $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$

Die COX-1 wird in den meisten Geweben konstitutiv gebildet, das heißt, sie wird dort regelmäßig, wenigen Schwankungen unterliegend, relativ unabhängig von exogenen Faktoren produziert, wohingegen die COX-2 nach Einwirkung von Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Stimuli vermehrt gebildet wird. Das unterschiedliche Vorkommen der Isoformen der COX-1 und COX-2 führte zu der Vermutung, dass einige Nebenwirkungen der NSAR (wie gastrointestinale Ulcera, Blutungen, Plättchen-Dysfunktion) v.a. auf der Hemmung der COX-1 beruhen und dass die Hemmung der COX-2 entscheidend für die anti-inflammatorische, analgetische und antipyretische Wirkung der NSAR ist (88).

Bereits 1863 vermutete Virchow, dass Krebs in der Nähe von Orten chronischer Entzündungen entsteht.

Anfang der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts fiel erstmals auf, dass viele humane Neoplasien mehr Prostaglandine produzieren als die gesunden Gewebe, aus denen sie hervorgehen.

Vermehrte Synthese von Prostaglandinen in transformierten Zellen könnte eine Konsequenz verstärkter COX-2-Expression sein (40), denn die COX-2 ist häufig in Malignom-Geweben verstärkt ausgeprägt und oft mit einer schlechten Prognose verbunden, z.B. bei NSCLC (188), Zervix- (44), Mamma- (120), Blasen- (183) und Kolorektalkarzinom (155) sowie beim serösen Ovarialkarzinom (42).

Diese Hypothese wird untermauert durch epidemiologische und experimentelle Ergebnisse, dass die COX-Hemmer gegen eine Reihe von Tumoren schützen können (17), (48), (49).

Dies bezeichnet man auch als chemopräventiven Effekt.

1.2.1.3) Mögliche antikarzinogene Wirkmechanismen von Celecoxib

Hier kann man zwei grundlegende molekulare Mechanismen unterscheiden:

a) COX-2-vermittelte Wirkweise:

Hier geht es um die klassische Wirkung der COX-2-Hemmer, die auch ihre antientzündlichen Eigenschaften bedingt, nämlich die Hemmung der Cyclooxygenase-Reaktion und den damit verbundenen Abfall des Prostaglandin-Spiegels.

Prostaglandine gehören zur Gruppe der Eicosanoide. Diese können ihre biologischen Effekte intrakrin oder autokrin bzw. parakrin ausüben (55), (108). Erhöhte COX-2-mRNA- und Proteinspiegel, die man in prämaligen und malignen epithelialen und nicht-epithelialen Tumoren beobachtet, gehen immer mit einer Akkumulation von COX-2-abgeleiteten Prostaglandinen einher (47). Das COX-2-Derivat Prostaglandin E₂ wird zum Beispiel in humanen kolorektalen Karzinomen sehr stark gebildet (119).

Hier folgen einige Beispiele, wie Celecoxib durch die Unterdrückung des COX-2-Weges Tumoren bzw. Tumorzellen beeinflussen kann:

- 1) Steigerung der Apoptoserate durch Hemmung der Prostaglandin E₂- und Bcl-2-Expression (103) (Bcl-2= antiapoptotisches Protein).
- 2) Abnahme der Proliferation von Tumorzellen durch Blockade des EGF-Rezeptors (=Epidermal Growth Factor Receptor) (175), (33) oder durch Blockade der Ras-MAPK-Kaskade (= mitogen activated Protein-Kinase) (174) oder durch Blockade der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Kaskade (26). Alle diese Effekte resultieren aus einer verminderten Prostaglandin E₂-Produktion.
- 3) Unterdrückung der Angiogenese. Ali-Fehmi et al. wiesen bei Patienten mit fortgeschrittenem, high-grade Ovarialkarzinom einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen der Höhe der COX-2-Bildung und der Dichte an Mikrogefäßen im Tumorgewebe nach (4). Für viele Tumoren gibt es auch eine starke Korrelation zwischen der Expression von COX-2 und der Bildung an VEGF (vascular endothelial growth factor), was zu gesteigerter Angiogenese im Tumor und letztendlich zu einer schlechteren Prognose führt (5).
- 4) Abnahme der Aggressivität durch Abnahme des COX-2-Spiegels. Die Expression korreliert positiv mit gesteigertem invasivem und metastatischem Wachstum von Brust-, Kolon-, Magen- und Lungenkrebszellen. Eine gesteigerte COX-2-Expression

induziert die Bildung der MMP1 und MMP2 (MMP=Matrix-Metallo-Proteasen) und fördert damit das Metastasierungspotential von humanen Kolonkarzinomzellen (169).

b) COX-2-unabhängige Wirkmechanismen:

- 1) Hemmung der Carboanhydrase (131). Dieses Enzym existiert in mehr als zwei Isoformen. Mindestens für zwei dieser Isoformen, und zwar die CA IX und XII ist bekannt, dass sie in verschiedenen Malignomen exprimiert werden und in das Tumorstadium impliziert sind (109). Celecoxib besitzt potente Carboanhydrase-hemmende Eigenschaften bereits im nanomolaren Bereich (68), (177).
- 2) Hemmung der PDK-1 (131), (52): Celecoxib kann die PDK-1 (Phosphoinositid-abhängige Kinase) binden und diese hemmen (8), (71). Die PDK-1 ist eine entscheidende Komponente für die Regulierung von Zellwachstum und Überlebens-signalwegen innerhalb der Zelle. Durch ihre Hemmung werden stromaufwärts und – abwärts gelegene Regulator-Proteine dieser Signalkaskade beeinflusst. Stromaufwärts handelt es sich dabei um die PI3K (=Phosphatidylinositol-3-Kinase) und stromabwärts um das Hauptsubstrat der PDK-1, die Akt/PKB (AKT/Proteinkinase B) und den Tumorsuppressor PTEN (Phosphatase und Tensin-Homolog-Protein). Diese Achse ist in vielen Tumorzellen chronisch aktiviert und trägt so zu Wachstum und Chemotherapie-Resistenz bei (71), (58).
- 3) Hemmung der SERCA (= Sarkoplasmatisches / Endoplasmatisches Retikulum ATPase) (131), (60): Die SERCA ist ein Transmembran-Protein des Endoplasmatischen Retikulums, das den steilen Kalziumgradienten zwischen Zytosol und endoplasmatischem Retikulum aufrecht erhält. Eine Hemmung dieser Pumpe führt zu einem raschen Übertritt von Kalzium ins Zytosol. Darauf folgt dann die Endoplasmatische Stress Response (ESR). Im Falle von persistierendem Endoplasmatischem Stress, kommt es zu programmiertem Zelltod (Apoptose). In Anwesenheit von Celecoxib scheint es zu diesem persistierenden Stress zu kommen (131). Viele Arbeiten haben gezeigt, dass diese Kalziumfreisetzung der am schnellsten auftretende Effekt nach Celecoxib-Gabe ist. Bereits nach Sekunden kann er in Zellkulturen festgestellt werden (164), (6), (60).

c) Gemeinsame Endstrecke der verschiedenen potentiellen Wirkmechanismen:

→Hemmung der Zellzyklusprogression (52):

Die Behandlung mit Celecoxib führt zu Zellzyklusarrest in verschiedenen Zellkulturen (53), (64).

→Induktion von Apoptose (52):

Viele Studien zeigen, dass Celecoxib seine antikarzinogenen Effekte in zahlreichen Krebszelllinien über die Induktion von Apoptose ausübt (53), (190), (58), (8).

Bei Behandlung von Tumorzellen mit Celecoxib beobachtet man einen Abfall des Spiegels folgender antiapoptotischer Proteine: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 und Survivin, wohingegen die Expression des proapoptotischen Proteins BAD (= Bcl-2 Associated Death promoter) (104) zunimmt und die Mitochondrien Cytochrom C freisetzen und die Kaspasen 3, 8 und 9 aktiviert werden (27), (66).

→Beeinflussung der Matrix-Metall-Proteasen und damit der Invasivität:

Celecoxib hemmt die Aktivität der Matrix-Metall-Protease in Lungen-Adenokarzinomzellen (111). Matrixmetallproteasen spielen eine Rolle bei Gewebeinvasion, Metastasierung und Angiogenese. Die MMP 2 und 9 sind Hauptenzyme zum Abbau von Kollagen IV, dem Hauptbestandteil von Basalmembranen).

→Hemmung der Angiogenese (s.o.)

1.2.1.4) Effekte von Celecoxib in der Behandlung des Ovarialkarzinoms

a) In vitro als Monotherapie:

Wang, H.J. et al. untersuchten 2007 die Effekte von Celecoxib auf Zellwachstum und Apoptose von SKOV-3-Zellen. Es zeigten sich eine dosisabhängige Hemmung des Zellwachstums und ein Anstieg der Apoptose-Rate (176).

Vital-Reyes, V. et al. untersuchten die Effekte von Celecoxib auf die Zelllinien CAOV3, OVCAR3 und SKOV-3. Bei allen Zelllinien kam es zu einer deutlichen Wachstumshemmung. Für die SKOV-3-Zellen wurde auch eine signifikante Veränderung der Apoptoserate und eine verminderte Bildung der COX-2 beobachtet (172).

Song, Y.C. et al. stellten Untersuchungen zur Bedeutung des p53-Status beim Ovarial-Karzinom an, da die Rate von mutierten p53 Fällen sehr hoch ist. Es zeigte sich, dass Celecoxib in einer wild-type-p53 Tumorzelllinie (PA-) das Zellwachstum stärker hemmte als in einer Null-Typ-p53-Zelllinie (SKOV-3). Also scheint das apoptotische Potential von Celecoxib zu variieren in Abhängigkeit vom funktionalen p53-Status einer Zelllinie (154).

b) *In vitro in Kombination:*

Bijman, M.N. et al. stellten fest, dass die Kombination von Celecoxib und Cisplatin, bei gleichzeitiger Verabreichung, bei vier Ovarialkarzinom-Zelllinien deutlich antagonistische Effekte nach sich zieht (15).

c) *In vivo als Monotherapie:*

Wang et al. stellten einen Rückgang des Tumorzumens bei mit Celecoxib behandelten Mäusen fest (176).

d) *In vivo in Kombination:*

Saucier, J.M. et al. konstatierten eine Verbesserung der Wachstumshemmung und Regression im Mäusemodell bei Kombination von liposomalem Doxorubicin mit Celecoxib (126).

1.2.1.5) Klinische Studien mit Celecoxib in der Krebstherapie

Klinische Studien mit Celecoxib in der Krebstherapie wurden bis jetzt nur als Kombinationstherapien durchgeführt. Meistens wurde Celecoxib in Kombination mit einem oder mehreren klassischen Chemotherapeutika eingesetzt.

a) Phase 1-Studien:

Die Phase 1-Studien zur Dosis-Findung und Pharmakodynamik verliefen überwiegend positiv. Vereinzelt wurden jedoch auch hier kardiovaskuläre Ereignisse beschrieben. Teilweise kam es zu unvorhersehbaren anderen Dosis-limitierenden Nebenwirkungen.

b) Phase 2-Studien:

In fast allen Phase-2-Studien wurde Celecoxib in der aus den Phase 1-Studien erprobten Dosierung von 2x 400mg täglich verwendet.

Insgesamt muss man leider feststellen, dass die Ergebnisse der Phase 2-Studien von Celecoxib - meist in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika - eher enttäuschend ausgefallen sind.

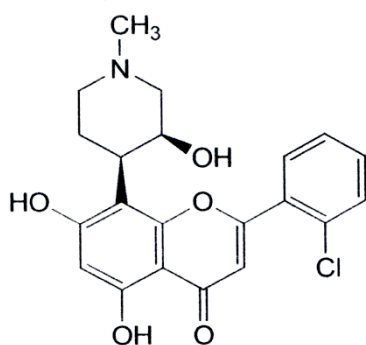
In der Literatur existieren jedoch auch Beispiele für nebenwirkungssenkende und/oder antitumorös wirkende Kombinationen; und zwar für die Kombination von Celecoxib mit niedrig dosiertem Cyclophosphamid (19) und die Kombination von Celecoxib mit Capacetibine (157), (43). Die Verfasser der letzten Studie schlagen vor, die klinische Relevanz der COX-2-Expression von Tumoren als mögliche Determinante für das Ansprechen auf Celecoxib noch weiter zu untersuchen.

1.2.2) Flavopiridol

1.2.2.1) Allgemeines

Flavopiridol ist ein halbsynthetisches niedermolekulares Derivat der Rohikutine, einem Alkaloid, das aus der indischen Pflanze *Dysoxylum binectariferum* isoliert werden konnte. Zunächst stellte das National Cancer Institut der USA Mitte der neunziger Jahre seine starke Wirksamkeit auf 60 verschiedene Krebszelllinien und ihre Proliferation fest, ohne ersichtliche Tumor-Typ-Selektivität (140).

Flavopiridol ist ein pan-CDK-Inhibitor, der in der Lage ist, unterschiedliche CDKs zu hemmen (135). Die antitumoröse Aktivität von Flavopiridol scheint mit CDK-Hemmung, Induktion von Apoptose, Transkriptionshemmung und antiangiogenetischer Wirkung zusammenzuhängen (31).



Flavopiridol

Abbildung 2: Strukturformel Flavopiridol (138)

Summenformel: $C_{21}H_{20}ClNO_5$

CDKs (=Cyclin dependent Kinases) sind Serin/Threoninkinasen. Nach ihrer Aktivierung induzieren sie kaskadenartige Prozesse vermittelt durch die selektive Phosphorylierung von Proteinen (171). CDKs bestehen aus einer katalytischen Kinase-Untereinheit und aus einer regulatorischen Cyclin-Untereinheit. Nur wenn sich diese Einheiten zusammenlagern, kann die CDK katalytisch tätig werden.

Zu den CDKs gehört eine Gruppe von Enzymen, die Schlüsselemente für den Ablauf des Zellzyklus darstellen (98). Eine weitere wichtige Rolle spielen die CDK-Komplexe auch in der Transkription von RNA (128).

Die Aktivität der CDKs wird negativ beeinflusst durch direkte Interaktion mit Proteinen, die man als CDK-Inhibitoren bezeichnet. Hier gibt es zwei Familien: Die INK4-Familie hemmt vor allem Cyclin D-assoziierte Kinasen, während die Cip/Kip-Familie unspezifisch alle CDKs hemmt (150), (149).

1.2.2.2) Wirkmechanismen von Flavopiridol

Flavopiridol bindet direkt an die ATP-Bindungsstelle der meisten CDKs und steht somit in direktem Wettbewerb mit ATP (135), (34).

Folgende Wirkungsmechanismen sind bekannt:

1) *Induktion von Zellzyklusarrest*

Die Hemmung von CDK 4/6 induziert starken G₁-Arrest in vitro und Tumorregression in vivo (144). Die Cyclin D abhängige Kinase 4 und 6 sowie der Cyclin E-cdk2 Komplex phosphorylieren (in dieser Reihenfolge) das Retinoblastom Protein (Rb) und ermöglichen so den Übergang von der G₁- in die S-Phase über eine Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F (151).

Die CDK1/2-Hemmung hat vor allem Effekte auf die S- und G₂-Phase.

CDK 2 und 1 und der Cyclin B-cdk1-Komplex sind (in dieser Reihenfolge) notwendig für einen ordnungsgemäßen Ablauf der S-Phase und den Übergang von der G₂- in die M-Phase (112).

2) *Hemmung der Aktivierung von CDKs allgemein*

Die Hemmung der CDK 7 verhindert Phosphorylierungen, die notwendig sind, um andere CDKs zu aktivieren (180). Die CDK 7 wird auch als CAK (= CDK-aktivierende Kinase) bezeichnet.

3) *Hemmung der Transkription*

Die Komplexe CyclinH-cdk7, CyclinC-cdk8 und CyclinT-cdk9 (letzterer ist auch besser als pTEFb= positiver Transkription-Elongationsfaktor b bekannt) sind in der Lage, die carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II zu phosphorylieren und damit zu aktivieren.

RNA-Polymerasen sind Enzyme, die die Synthese von Ribonukleinsäuren bei der Transkription der DNA katalysieren. Vor allem die Hemmung der CDK 9 beeinflusst umfassend die zelluläre Transkription. Die stärkste Auswirkung zeigt sich auf die Synthese von mRNAs mit kurzer biologischer Halbwertszeit, die unter anderem für Wachstums- und Apoptose-Regulatoren kodieren (28), (75). Somit kontrollieren diese CDK-Cyclin-Komplexe wirksam die Elongation (128).

4) *Induktion von Apoptose*

Flavopiridol kann über viele verschiedene Wege Apoptose einleiten (106). Es ist gut möglich, dass dies unabhängig von der CDK-Hemmung geschieht. Denn Flavopiridol tötet nicht nur sich teilende Zellen sondern auch ruhende Zellen (16), (13). Diskutierte Mechanismen sind die Abnahme der Expression antiapoptotischer Proteine wie Survivin, Bcl-2, Mcl-1, XIAP (173).

5) *Antiangiogenetische Aktivität*

Flavopiridol besitzt einige wichtige Eigenschaften, die die Angiogenese negativ beeinflussen, wie z.B. die Induktion von Apoptose in Endothelzellen oder die Hemmung der Induktion von VEGF unter hypoxischen Bedingungen (106).

6) *Antivirale Aktivität*

Flavopiridol blockiert die Replikation von HI-Viren durch Hemmung der CDKs 2 und 9, die wichtige Kofaktoren für die HIV-1-Tat-Transaktivierung sind (113).

1.2.2.3) Effekte von Flavopiridol in der Behandlung des Ovarialkarzinoms

a) *In vitro als Monotherapeutikum:*

Mayer, F. et al. beobachteten eine dosisabhängige Wachstumshemmung für SKOV-3-Zellen nach Inkubation mit Flavopiridol (96).

Für eine murine Ovarialkarzinomzelllinie namens OCA-I wurde nach Behandlung mit Flavopiridol eine von der Dosis abhängige Hemmung des Zellwachstums, eine Akkumulation der Zellen in der G₁- und G₂-Phase sowie eine Steigerung der Apoptoserate festgestellt. Hauptaussage dieser Studie war jedoch, dass Flavopiridol die Radiosensitivität der Zellen dosisabhängig maßgeblich verstärkte (116).

Keith, Bible, Scott, Borner et al. entdeckten mit OV202 hp (für high passage) eine Zelllinie, die nach längerer Passage in Gewebekultur eine Resistenz gegenüber Flavopiridol und auch gegenüber Cisplatin entwickelte. Das Nicht-Ansprechen mancher Patienten in Phase I und Phase II Studien (s.u.) lässt vermuten, dass Resistenzentwicklungen gegenüber Flavopiridol auch im klinischen Rahmen eine Rolle spielen (11).

Die aktuellste Studie bezüglich Flavopiridol in der Behandlung des Ovarial-Karzinoms aus China berichtet über eine Zunahme der Apoptoserate und der in der G₁-Phase befindlichen Zellen bei gleichzeitiger Abnahme der S-Phase, und zwar bei AO-Zellen (153).

b) *In vitro in Kombination:*

Bis zum heutigen Tag lag der Schwerpunkt der Forschung hinsichtlich sinnvoller Kombinationspartner für Flavopiridol vor allem auf den klassischen Chemotherapeutika und in Kombination mit der Strahlentherapie.

In vitro wiesen Makhija et al. 1997 einen synergistischen Effekt für die Kombination aus Cisplatin und Flavopiridol nach, wenn die Verabreichung von Flavopiridol 24 Stunden nach der von Cisplatin erfolgte. Verwendete Zelllinien waren hier u.a. die SKOV-3 Zell-Linie (90).

Bei den Untersuchungen zu synergistischen Effekten von Flavopiridol mit anderen Chemotherapeutika auf Tumoren, stellte sich heraus, dass ein Synergismus wesentlich von der Verabreichungsfolge der Medikamente abhängig ist (12), (132).

c) in vivo als Monotherapeutikum:

In vivo zeigte Flavopiridol auf einen OCa-I-Tumor im Mäusemodell folgende Effekte: Allgemeine Wachstumsverzögerung, Verstärkung der Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber der Strahlentherapie sowie antimetastatische Aktivität auf Lungenmetastasen eines spontan metastasierenden Tumortyps (94).

In der neuesten Studie war das Überleben von Versuchsmäusen mit Ovarial-Karzinom vom Zelltyp AO nach Behandlung mit Flavopiridol signifikant verlängert gegenüber der Kontrollgruppe mit PBS. Das Tumorwachstum war um 40% vermindert (153).

1.2.2.4) Klinische Studien mit Flavopiridol bis zum heutigen Tag

a) Flavopiridol als Monotherapeutikum

Die hohe Wirksamkeit, die Flavopiridol in den präklinischen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigte, konnte bis jetzt nicht auf den klinischen Kontext übertragen werden (143). Zusammenfassend kann man sagen, dass Flavopiridol als Einzelsubstanz enttäuscht hat.

Die ersten Phase 1-Versuche arbeiteten mit 72-stündigen Dauerinfusionen, die alle zwei Wochen wiederholt wurden. Die MTD (maximal tolerierbare Dosis) lag bei $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{d} \times 3$. Die DLT (dose limiting toxicity) war sekretorische Diarrhoe (141).

Die sich daran anschließenden Phase 2-Versuche versagten für alle untersuchten Tumortypen (156), (133), (146), (2), (85). Zusätzlich kam es zu zahlreichen toxischen Nebenwirkungen.

Daraufhin wurden Phase 1-Versuche entworfen, mit dem Ziel, höhere Plasma-Konzentrationen zu erlangen und zwar durch Gabe eines einstündigen Bolus über mehrere Tage mit Wiederholung in dreiwöchigen Abständen. Dosis-limitierende toxische Nebenwirkungen waren Neutropenie, gastrointestinale Unverträglichkeit, Hypotension und ein Proinflammatorisches Syndrom (162).

In den folgenden Phase 2-Versuchen wurde mit diesem Schema weitergearbeitet.

Auch hier konnte kein durchschlagender Erfolg verzeichnet werden. Eine gewisse Wirksamkeit konnte nur bei Behandlung des Mantelzell-Lymphoms (70), des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms (170) und als Second-Line-Chemotherapie in der Behandlung des Endometriumkarzinoms (50) beobachtet werden.

Zuletzt zeigte Flavopiridol als Einzelsubstanz in einem erneut veränderten Verabreichungsmodus gute Resultate bei Behandlung von refraktären Chronischen Lymphozytären Leukämien mit besonders hohem genetischem Risiko (22). Gerade die letzte Studie zeigt, dass hinsichtlich eines optimalen Behandlungsschemas in Kombination mit anderen Medikamenten in der Klinik weiterhin Forschungsbedarf besteht.

b) Flavopiridol in Kombination mit anderen Medikamenten:

Bis jetzt sind vor allem Phase 1-Untersuchungen über die Kombination von Flavopiridol mit Chemotherapeutika durchgeführt worden, die zum Teil Hoffnung machen auf die noch folgenden Phase 2-Untersuchungen.

Die am häufigsten untersuchten Kombinationen sind:

- 1) Flavopiridol und Docetaxel (ein Taxan):
→ Teilweise gute Effekte auf solide Tumoren (134), (163), (41), (46).
- 2) Flavopiridol und Cisplatin oder Carboplatin im Vergleich:
→relativ gute Verträglichkeit für Cisplatin + Flavopiridol
→starke toxische Effekte bei Gabe von Carboplatin mit Flavopiridol (14).
- 3) Flavopiridol und Irinotecan in der Behandlung von fortgeschrittenen soliden Tumoren:
→ermutigende klinische Aktivität (142).
- 4) Flavopiridol gefolgt von 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine und Mitoxantrone in der Behandlung von Leukämien des Erwachsenen:
→Anti-AML-Aktivität von Flavopiridol sowohl allein als auch in Kombination (64).

Diese Studien verdeutlichen, dass die Suche nach geeigneten Kombinationspartnern für die Substanz Flavopiridol noch nicht als abgeschlossen betrachtet werden kann.

1.3) Synergismus und Synergismus-Theorie

1.3.1) Definition und Erläuterung

Synergismus bezeichnet ganz allgemein das Zusammenwirken von Lebewesen, Stoffen oder Kräften, die sich gegenseitig unterstützen bzw. fördern.

Synergismus in der Medizin / Pharmakologie:

Auch in der Medizin spielen Synergismen eine wichtige Rolle, und zwar besonders in der Arzneimitteltherapie. Hier ist es besonders interessant, zu untersuchen, ob zwei gleichzeitig eingenommene Medikamente ihre Wirkungen gegenseitig verstärken. Es gibt natürlich auch den entgegengesetzten Effekt, dass zwei Medikamente so interferieren, dass die Wirkung des einen oder beider abgeschwächt wird.

Von synergistisch wirkenden Substanzen erhofft man sich neben einer stärkeren Wirkung auch eine Reduktion der Nebenwirkungen der einzelnen Substanzen, die dann jeweils in geringerer Dosierung eingenommen werden müssen, um gleiche Effekte zu erzielen. Auch hier kann es zu einer Verstärkung der Nebenwirkungen oder zum Auftreten neuer, unvorhergesehener Nebenwirkungen kommen.

Die Identifikation synergistischer Substanz-Kombinationen und ihrer optimalen Dosierungsverhältnisse erfolgt häufig nach dem Prinzip von "Trial and Error". Synergismus tritt auf, wenn die Kombination zweier Medikamente eine stärkere Antwort hervorruft als man aufgrund der reinen Additivität (= keine Interaktion) und der Effekte der Medikamente, wenn sie allein verabreicht werden, annehmen könnte. Eine Steigerung der Antwort ist vorteilhaft, wenn das Gleichgewicht zwischen erwünschten therapeutischen Effekten und unerwünschten Nebenwirkungen dadurch verbessert wird. Dieser Vorteil kann aber auch durch eine Reduktion der Nebenwirkungen erreicht werden, ohne dass der therapeutische Effekt an sich zunimmt (61). Das heißt, dass auch die reine Additivität zweier Substanzen im klinischen Alltag von wichtiger Bedeutung für die Gesundheit / das Wohlbefinden der Patienten sein kann.

1.3.2) Mathematisches Modell zur Beurteilung von synergistischen Effekten in der Pharmakologie

Gerade für in vitro Untersuchungen ist das Modell der Isobologrammen gebräuchlich, das von Loewe bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts entwickelt wurde.

Eine Substanz A soll mit einer Dosis A' eine maximale Wirkung(=100%) auslösen. Eine andere Substanz B führt im gleichen System ebenfalls zu einer maximalen Wirkung (=100%), und zwar mit der Dosis B' .

Wenn in der Kombination der beiden Substanzen die halbe Dosis A' ($0,5 A'$) und die halbe Dosis B' ($0,5 B'$) ebenfalls zu 100% Wirkung führen, so liegt ein additiver Synergismus vor.

Wenn jedoch in einer Kombination von A und B die Dosis $0,5A'$ zusammen mit der Dosis $0,25B'$ zu einer Wirkung von 100% führt, so entspricht dies einem superadditiven Synergismus. Mathematisch gesehen entspricht ein superadditiver Synergismus nicht einer Potenzierung (39).

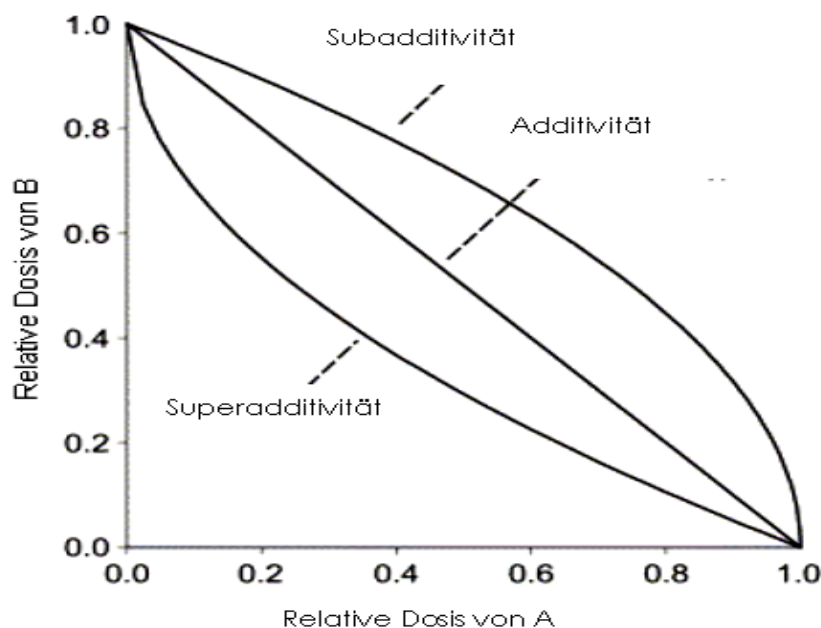


Abbildung 3: Loewe-Kombinationsquadrat

Auf der x- und y-Achse werden die Dosierungen von A und B aufgetragen.

Jeder Punkt auf einer Isobolenlinie oder Gerade entspricht einer Kombination aus einer bestimmten Dosis A und einer bestimmten Dosis B, deren Wirkung, hier als 100% festgelegt wurde.

Gerade: Additive Wirkung. Konkave Isobole: Superadditive Wirkung. Konvexe Isobole: Subadditive Wirkung.

Bestimmung des Interaktionsindex nach Tallarida:

Dosierungen, die den gleichen Effekt erzeugen, werden Isobole genannt und mit der Isobolen-Methode beschrieben. Ein Maß zur Bestimmung des Synergismus ist der Interaktionsindex γ , der folgendermaßen definiert wird:

$$\gamma = a/A + b/B$$

„A“ und „B“ entsprechen den Einzeldosierungen, die einen bestimmten gleichen Effekt hervorrufen, „a“ und „b“ ist die Kombinationsdosis der beiden Substanzen, die auch eben diesen Effekt erzeugt.

Die Werte für A und B erhält man aus den experimentell ermittelten Dosis-Antwort-Kurven (dose-response-curves) von A und B und der Kombination.

Ist $\gamma = 1$, wirken die beiden Medikamente additiv, ist $\gamma < 1$ liegt eine superadditive Wirkung der Kombination vor. Bei $\gamma > 1$ wirken sie subadditiv oder antagonistisch (161).

1.3.3) Begründung für die Auswahl von Celecoxib und Flavopiridol als

Versuchspartner

- 1) Für beide Medikamente wurde festgestellt, dass sie das Fortschreiten des Zellzyklus und das Zellwachstum hemmen.
- 2) Beide Medikamente können Apoptose induzieren.
- 3) Beide besitzen anti-angiogenetische Eigenschaften.

Aufgrund der gemeinsamen Endpunkte der Wirkung der beiden Medikamente, ist es gerechtfertigt, eine Untersuchung zu einem möglichen synergistischen Wirkungsprofil anzustellen.

Wie in der Vorstellung der beiden Medikamente beschrieben, erreichen die Substanzen ihre Effekte über unterschiedliche molekulare Mechanismen, was ein positives Zusammenwirken beider möglich macht.

1.4) Vorstellung der nachzuweisenden Proteine

1.4.1) PKB/Akt

1.4.1.1) Aufbau, Struktur, Signalweg, Aktivierung

Die Protein-Kinase B, auch AKT genannt, ist eine Serin-Threonin-Kinase.

Sie existiert in drei Isoformen: AKT 1, 2 und 3.

Der Aufbau der drei Isoformen ist sehr ähnlich. Die Protein-Kinase B besteht aus drei Domänen:

- der N-terminalen PH-Domäne (PH= Pleckstrin-Homologie)
- der zentralen Kinase-Domäne
- der C-terminalen hydrophoben Domäne.

Die AKT/PKB-Kinasen sind Schlüssel-Vermittler in Signalkaskaden, die grundlegende zelluläre Prozesse steuern wie Zellwachstum, Proliferation, Überleben, Glukose-Metabolismus, Genom-Stabilität und Neovaskularisation.

Im PKB-Signalweg spielen stromaufwärts gelegene Elemente eine Rolle, die die PKB hemmen oder aktivieren können, sowie die in der Signalkaskade stromabwärts gelegene Substrate der PKB und deren Funktionen (10).

Die AKT-Kinasen werden normalerweise aktiviert durch die Bindung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen an Tyrosinkinase-Rezeptoren. Wichtig für die Aktivierung von AKT sind Translokation zur Membran und Phosphorylierung (10).

Die über den Wachstumsfaktor-Rezeptor stimulierte Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) erzeugt 3'-phosphorylierte Phospholipide an der Plasmamembran, nämlich 3,4,5-Triphosphat und 3,4-Diphosphat. Diese Lipide besitzen hohe Affinität zur PH-Domäne von AKT und vermitteln dessen Translokation zur Membran. Dort erfolgen weitere aktivierende Phosphorylierungsschritte, u.a. durch die PDK-1 (3).

Die potentiell onkogene Achse PI3K/AKT wird direkt inaktiviert durch den Tumorsuppressor PTEN. PTEN fungiert als Phosphatase und senkt den Spiegel an Phosphoinositid-Di- und Tri-Phosphat (38).

1.4.1.2) Zelluläre Funktionen von AKT und die Bedeutung für humane Karzinome (10)

1) Förderung der Zellproliferation durch:

- Verhinderung des Abbaus von Cyclin D1 und Verstärkung der Translation von Cyclin D1 und D3 (102).
- Direkte Antagonisierung der Wirkung der Zellzyklusinhibitoren p21^{WAF1} und p27^{Kip1} (166).
- Hemmung des Tumorsuppressors p53 über Mdm2 (166).

2) Förderung des Überlebens von Zellen durch (eine Auswahl):

- Phosphorylierung des proapoptotischen Faktors BAD, der dann inaktiviert ist.
- Hemmung der Kaspase-Kaskade für intrinsischen Zelltod.
- Abbau der IκB Kinase (IKK) und daraus folgender NFκB vermittelten Transkription antiapoptotischer Gene (10).

3) Steigerung der Proteinsynthese:

- durch Phosphorylierung von mTOR, dass dann selbst andere Komponenten phosphoryliert, was zu verstärkter Translation von mRNA und letztlich Proteinsynthese führt (86), (93).

AKT spielt, wie oben bereits erwähnt, eine zentrale Rolle in vielen Prozessen, die als essentiell für Krebs und seine Entstehung gelten. Bei vielen humanen Neoplasien sind Veränderungen im Bereich der AKT-Signalkaskade anzutreffen.

So konnte für einige Ovarialkarzinome und Zelllinien eine Amplifikation und vermehrte Expression des *AKT2*-Gens festgestellt werden (29) sowie der Verlust an PTEN (s.o.) und/oder eine Aktivierung von AKT (72), (130), (147).

Was die Spezifität der Subtypen von AKT angeht, so ist eine verstärkte Aktivität der AKT1-Kinase für etwa 40% aller Ovarialkarzinome beschrieben (158). Eine Aktivierung der AKT2-Kinase wird bei 30% der Ovarialkarzinome beobachtet (188).

Es wird vermutet, dass AKT-Aktivierung zu Strahlen- und Chemotherapie-Resistenz von Tumoren beiträgt, und in experimentelle Studien, bei denen niedermolekulare PI3K/AKT-Signalweg-Hemmer mit Standard-Chemotherapeutika kombiniert wurden, zeigte sich eine Verringerung der chemotherapeutischen Resistenz (179).

1.4.2) Die RAS-Proteine (115)

1.4.2.1) Bedeutung, Funktion und Struktur

In ca. 20-30% aller menschlichen Tumoren kann man Punktmutationen im ras-Gen aufdecken. Dadurch kommt es zum Austausch von Aminosäuren an bestimmten Stellen der Proteine. Dieser Austausch führt zum Verlust der intrinsischen und auch der GAP-katalysierten Hydrolyse von GTP. Das heißt, das Ras nur noch im aktivierten bzw. „An“-Zustand vorliegt mit verheerenden Konsequenzen für die Zelle (115).

Das natürliche zelluläre Ras-Proto-Onkogen wird zum Onkogen. Es kann zu Zellzyklusprogression, Proliferation und Transformation kommen (35).

RAS-Proteine gehören zur großen Familie der kleinen GTPasen, die als Antwort auf unterschiedliche extrazelluläre Stimuli aktiviert werden. Defekte im Ablauf der RAS-Signalwege können zu maligner Transformation führen.

Ras-Proteine kontrollieren zelluläre Signalwege, die für Wachstum, Migration, Adhäsion, zytoskelettale Integrität, Überleben und Differenzierung eine Rolle spielen.

Ein gemeinsamer Gesichtspunkt der RAS-Proteine ist, dass sie in Signalwege über Zellmembranen hinweg involviert sind, insbesondere bei Signalvermittlung durch Wachstumshormone. Ihre Hauptaufgabe ist es, flüchtige Signal-Komplexe an der Zellmembran zu sammeln, um dann Signalwege zu induzieren, die Transkription, Zellform, Migration, Endozytose, Zellüberleben, Zellzyklusprogression, Differenzierung, Alterung und vieles mehr koordinieren (115).

Es ist schwer, genaue Kriterien für die Zugehörigkeit zur RAS-Familie aufzustellen. Die humane RAS-Gen-Familie besteht aus drei Mitgliedern, und zwar H-, K- und N- *ras*, die für Proteine von 88-89 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 2.000 (p2) Dalton kodieren (115).

All diese Proteine sind in der Lage GTP und GDP mit hoher Affinität zu binden und besitzen normalerweise selbst eine geringe GTP-spaltende Aktivität (35). Sie funktionieren wie binäre molekulare Schalter, wobei sich ihre stereochemische Konformation abhängig von der Bindung an GTP oder GDP ändert. Die GTP-bindende Form entspricht „On“, die GDP-bindende Form „Off“.

Um den Übergang zwischen „Off“- und „On“- Zustand zu erleichtern, gibt es spezialisierte Proteine, die die GTP-Hydrolyse beschleunigen. Sie werden als GAPs bezeichnet (GTPase activating proteins). Um die GTPasen wieder mit GTP aufzuladen, muss die Bindung von

GDP an die GTPasen abgeschwächt werden. Dafür sorgen sogenannte Guanin-Nukleotid-Exchange-Factors (GEFs), die den Ersatz von GDP durch GTP katalysieren (115).

1.4.2.2) RAS-Effektoren und die wichtigsten Signalkaskaden (178)

Ras-Effektoren sind Proteine mit einer starken Affinität zu GTP-Ras. Sie sind gekennzeichnet durch eine putative Ras-Bindungs-Domäne (RBD). Die Bindung von Ras-Effektor-Proteinen triggert bestimmte Signalkaskaden.

Am bekanntesten ist wohl die RAF und MEK/ERK-Kaskade. Hier wird RAS aktiviert durch die „Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase“. Das aktivierte Ras bindet an die Raf-Serin/Threonin-Kinase und fördert dadurch ihre Translokation an die Zellmembran. Nach weiteren überwiegend durch Phosphorylierungsreaktionen bestimmten Schritten kommt es über die Mitogen-activated-protein-Kinasen (MAPK) ERK1 und 2 (=“extracellular signal-regulated-kinase“) zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Zusammengefasst können diese ERKs den Zellmetabolismus, Translationsfaktoren, Signalmoleküle und die Genexpression beeinflussen.

Ras besitzt eine Bindungsdomäne für die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und kann selbige aktivieren. Nach Aktivierung der PI3K erzeugt diese Phosphatidylinositol-Tri-Phosphat (PIP3). PIP3 rekrutiert die PDK-1 (Phosphatidyl-Inositol-dependent Kinase) und PKB/AKT zur Plasmamembran, wo die PDK-1 dann AKT phosphoryliert und aktiviert (115). Für humane Ovarialkarzinomzellen wurde bereits berichtet, dass v-Ha-ras-vermittelte PI3K-Aktivierung zur Aktivierung von AKT2 führt (84).

1.5) Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen die Effekte des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib und des Zytostatikums Flavopiridol auf das Wachstumsverhalten von zwei humanen epithelialen Ovarialkarzinomzelllinien *in vitro* untersucht werden.

Es existieren zahlreiche Arbeiten sowohl zu Celecoxib als auch zu Flavopiridol, die eine antikanzerogene Wirkung beschreiben.

Einen besonderen Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Suche nach möglichen synergistischen Effekten der beiden Medikamente dar.

Es werden folgende Endpunkte betrachtet:

- Hemmen Celecoxib und Flavopiridol die Proliferation von BG-1- und SKOV-3-Zellen und welche Konzentrationen müssen verwendet werden, um eine signifikante Hemmung zu erreichen?
- Gibt es eine Abhängigkeit der Medikamentenwirkung von der Dauer der Inkubationszeit und wenn ja, nach welcher Inkubationsdauer ist eine maximale Wachstumshemmung erreicht?
- Führt eine Kombination der beiden Medikamente zu einer Steigerung der antiproliferativen Effekte? Zeigt sich ein synergistisches Zusammenwirken der beiden Substanzen?
- Wie beeinflussen Celecoxib und Flavopiridol als Einzelsubstanzen den Zellzyklus von SKOV-3- und BG-1-Zellen? Welche Effekte zeigt hier die Kombination der beiden Substanzen?
- Können Flavopiridol und / oder Celecoxib bei den hier untersuchten Zelllinien Apoptose induzieren? Führt die gemeinsame Applikation beider Substanzen zu Veränderungen der Apoptose-Rate?
- Wie wirkt sich die Behandlung von SKOV-3- und BG-1-Zellen mit Celecoxib und / oder Flavopiridol auf deren Protein-Expression aus? Hierfür wird die Expression der Proteine AKT und RAS untersucht.

2) Material und Methoden

2.1) Material

2.1.1) Biologisches Material

Humane Zelllinien:

BG-1-Zellen:	Adenokarzinom des Ovars. Östrogenrezeptor-positiv, östrogensensitiv. Zur Verfügung gestellt durch die Universität Bonn.
SKOV-3-Zellen:	Adenokarzinom des Ovars. Östrogenrezeptor-positiv, östrogeninsensitiv. Zur Verfügung gestellt durch die Universität Bonn.

2.1.2) Chemikalien, Enzyme, Antikörper

Acrylamid	Roth, Steinheim
Ampuwa	Braun, Melsungen
Anti-Beta-Aktin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Pan-Ras	Merck, Darmstadt
Anti-AKT	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Alternative M DTT	Sigma, Steinheim
APS	Merck, Darmstadt
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biotinylated Protein Ladder Detection Pack	Cell Signaling Technology, Beverly in USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Celecoxib	Pfizer, New York, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
Dry Milk	Roth, Karlsruhe
ECL western blotting detection and Analysis system	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS-Clean	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Flow	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Rinse	BD Biosciences, San Jose, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biokrom AG, Berlin
Flavopiridol	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Glycerol	Sigma, Steinheim
Kristallviolett	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Natriumtristickstoff (NaN_3)	Serva, Heidelberg
PBS	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Phenylmethylsulfonylfluorid- Proteaseinhibitor (PMSF)	Fluka, Neu-Ulm
Ponceau-Rot-Färbung	Sigma, Steinheim
Propidiumiodid	Calbiochem, Darmstadt
RNAse Stammlösung	Serva, Heidelberg
RPMI 1640 mit stabilem Glutamin	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Towbin-Buffer	Serva, Heidelberg
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Serva, Heidelberg

Tris HCl	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Bio Rad, Hercules, USA
Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Serva, Heidelberg
Trypsin / EDTA-Lösung	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Tryptanblau 0,4%	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Tween 20	Serva, Heidelberg

2.1.3) Kits

Annexin-V-Fluos Staining Kit	Roche, Penzberg
BM Chemiluminescence Western Blotting Kit	Roche, Penzberg
Micro BCA TM Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, Irland

2.1.4) Kulturmedien, Lösungen, Ansätze

Zellkultur

<i>Kulturmedium:</i>	88 ml DMSO 10 ml FCS 1ml Penicillin-Streptomycin 1ml Natriumpyruvat
<i>Einfriermedium:</i>	90 ml FCS 10 ml DMSO
<i>Zellkulturfärbelösung:</i>	5µl PBS 36µl Tryptanblau 0,4% 10µl Zellsuspension
<i>Kristallviolett-färbelösung:</i>	0,05% Kristallviolett 25% Methanol 75% Ampuwa
<i>Entfärbelösung:</i>	0,1M Natriumacetat 50% Ethanol 50% Ampuwa

FACS und Annexin

<i>Waschpuffer:</i>	PBS 0,01 % NaN ₃ 2% FCS
<i>RNAse Stammlösung:</i>	1mg Stammlösung / ml PBS, 5 min auf 100°C erhitzen
<i>Propidiumiodid-Stammlösung:</i>	1mg Propidium / ml H ₂ O
<i>Fixierlösung:</i>	70 ml Ethanol 30 ml Ampuwa

Western Blots

<i>Trenngel, SDS, 12 %ig</i>	3,3 ml H ₂ O 4 ml Acrylamid 30%ig 2,5 ml Tris 1,5M pH 9,2 0,1 ml 10% SDS 0,1 ml 10% APS TEMED, 0,004 ml
<i>Sammelgel</i>	2,7 ml H ₂ O 0,67 ml 30% Acrylamid 0,5 ml M Tris pH 6,8 0,04 ml 10% SDS 0,04 ml 10% APS 0,004 ml TEMED
<i>1xLämmli-Puffer für Elektrophorese-Kammern:</i>	15,1 g Tris Base 72 g Glycin 5 g SDS auf 1000 ml H ₂ O
<i>Loading Puffer 4 x SDS reduzierend:</i>	2,5 ml 1M Tris pH 6,8 2 ml 40%ig SDS 4 ml Glycerol 0,5 ml H ₂ O 1mg Bromphenolblau Vor Gebrauch zu 90µl Puffer 10µl 2-Mercaptoethanol zusetzen
<i>Towbin Blot Puffer (Semi-Dry Blot Puffer):</i>	3,03 g Tris Base (25 mMol Tris) 14,4 g Glycin (192 mMol Glycin) 1000ml 20%ig Methanol pH 8,3

<i>Blocking Puffer:</i>	100 ml PBS 5 g Magermilchpulver 50 µl Tween 20
<i>Lysis-Puffer</i> <i>Mammalian Cells</i> <i>Stammlösung:</i>	10 mM Tris HCl (157,6 mg auf 100 ml) 140 mM NaCl (818 mg auf 100 ml) 3 mM MgCl ₂ (28,6 mg auf 100 ml) 1% Triton X-100 (1g auf 100 ml) In Ampuwa bei pH 8 herstellen
<i>Lysis-Puffer frisch:</i>	1ml Mammalian Cells Puffer 1µl PMSF
<i>1.- Antikörper:</i>	- Anti-Beta-Aktin 0,5µg / ml Blocking Puffer - Anti-AKT in Verdünnung 1:5000 in Blocking Puffer - pan-Ras 0,5µg / ml Blocking-Puffer
<i>2. – Antikörper:</i>	Anti-mouse IgG-POD anti-rabbit IgG-POD in Verdünnung 1:5000 in 5% Dry Milk in PBS + 0,05% Tween 20
<i>Anti-Biotin HRP-linked</i> <i>Antibody:</i>	Verdünnung 1:1000 in 5% Dry Milk in PBS + 0,05% Tween 20

2.1.5) Verbrauchsmaterial

Cryo-Tube	Nunc, Roskilde, Dänemark
Gewebekulturflaschen 250 ml und 550 ml	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturplatte 6 Well und 96 Well	Greiner, Frickenhausen
Hybond ECL Membran Amersham, Filterpapier (Nitrocellulosemembran)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Pipetten, Glas ; 1ml, 2ml, 5ml, 10ml	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen, Plastik 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Polystyrene Round-Bottom-Tube, 5ml (FACS-Röhrchen)	Falcon, Franklin Lakes, USA
PP-Röhrchen (15ml; 25ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Ritips-Pipetten (1,25ml; 2,5ml; 5ml)	Ritter, Schwabmünchen
Reaktionsgefäße 12ml, 50 ml	Eppendorf, Hamburg
Zellscrubber, klein und groß	Sarstedt, Newton, USA

2.1.6) Geräte, Software

Autoklav 2540 ELV	Tuttnauer Europe, Breda, Niederlande
Blotting Kammer	Bio Rad, Hercules, USA
Brutschrank Hera Cell	Heraeus, Hanau
Cell Quest Pro, Auswertungs-Software	BD Biosciences, San Jose, USA
Chemi Doc XRS, Quantity One (Software)	BioRad Laboratories, München
Elektrophoresekammern	Bio-Rad, Hercules, USA
ELISA-Software Magellan	Tecan, Grödig, Österreich
FACS-Gerät, FACSCalibur	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
Fireboy Plus	Integra Biosciences, Ferwald
Geldokumentationssystem mit CCD-Kamera, Chemidoc XRS	BioRad Laboratories, München
Gel-Kammer	Thermo, Bremen
Heizblock 100°C	Heidolph, Schwabach
Mikroskop, ID03	Zeiss, Jena
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Photometer ELISA Reader	Tecan, Grödig, Österreich
Pipetten Pipetman 2, 10, 20, 100, 200, 1000µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipetboy	Integra Biosciences, Ferwald
Schüttler	Heidolph, Schwabach
SPSS Statistik Software, Version 14	SPSS Inc, Chicago, USA

Stickstofftank locator junior plus	Barnstead, Dubuque, USA
Transferpette-8	Brand, Wertheim
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Wasserbäder mit und ohne Schüttelfunktion	GFL, Burgwedel
Zählkammer Neubauer Improved	Planoptik, Jena
Zellbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Zellbank Telestar Bio II-A,	Telestar Industrial, Terrassa, Spain
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

2.2) Methoden

2.2.1) Zellkultur, Anfärbung der Zellen, Proliferationsassays

Die Zelllinien SKOV-3 und BG-1 wurden in 75 cm² – Zellkulturflaschen mit Kulturmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37,5°C, 95%iger Wassersättigung und einem 5%igen CO₂ –Volumenanteil. Alle Arbeitsschritte der Zellkultur erfolgten unter einer sterilen Werkbank, ausschließlich unter Verwendung steriler Materialien, Chemikalien und Ansätze.

Wichtige Arbeitsschritte:

Wechsel des Kulturmediums:

Das Kulturmedium wurde nach drei bis vier Tagen gewechselt, spätestens bei einem Farbumschlag des Mediums von rosa nach gelb.

Passagieren von Zellen:

Bei 80%iger Konfluenz des Wachstums der Zellen wurden sie wie folgt passagiert: Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit 2ml Trypsin gespült, was nach kurzer Einwirkdauer mit 5ml Kulturmedium neutralisiert wurde. Die Zelllösung vom Flaschenboden wurde durch den Einsatz eines Zellsrabbers mechanisch gefördert. Die so gewonnene Suspension wurde dann in ein Falconröhrchen überführt und für 10min bei 1000U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit 4ml Medium resuspendiert und dann auf neue, schon mit Medium versehene Gewebekulturflaschen, verteilt.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der gezählten Zellen pro Flächeneinheit der Kammer.

Kryokonservierung von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden Kryokonserven hergestellt, die dann im Stickstofftank bei – 196°C aufbewahrt wurden. Die Herstellung erfolgte zunächst analog zum Passagieren, nur der letzte Schritt, die Resuspension, erfolgte mit 1ml eines Spezial-Einfriermediums. Die Kryokonserven wurden bei Bedarf aufgetaut.

Färbung der Zellen mit Kristallviolett:

Um die Proliferation der Zellen in Kultur zu bestimmen, bedarf es eines Verfahrens, dass verlässlich die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurde die Anfärbung der Zellen mit Kristallviolett verwendet, nachdem experimentell ermittelt bzw. bestätigt worden war, dass die Extinktion von mit Kristallviolett-angefärbten Zellen von der Zelldichte, also der Zahl der angefärbten Zellen abhängig ist.

Hierzu wurden die Zellen in aufsteigender Anzahl in einer 96 Well-Gewebekulturplatte ausgesät. Diese wurde dann zwei Tage im Brutschrank inkubiert, dann begann die Färbung, die aus den folgenden Schritten besteht:

- 1) 15minütige Fixierung der Zellen mit 25%igem Glutar-aldehyd (10µl pro Well).
- 2) Färbung mit Kristallviolettlösung für 15 Minuten auf dem Schüttler (100µl/Well).
- 3) Waschen der 96-Well-Platte mit Aquadest, Trocknen bei Raumtemperatur
- 4) Entfärbung mit Entfärberlösung für 30 Minuten (100µl/Well)

Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass sich die vorhandenen Proteine in den Zellen violett anfärben, wohingegen tote Zellen beim Fixieren und Waschen entfernt werden. Der Farbstoff wird dann durch den Entfärber in Lösung gebracht und kann so photometrisch bestimmt werden. Im Photometer wurde dann die Extinktion bei 560nm gemessen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B	L	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	12000	16000	20000	L
C	L	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	12000	16000	20000	L
D	L	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	12000	16000	20000	L
E	L	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	12000	16000	20000	L
F	L	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	12000	16000	20000	L
G	L	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	12000	16000	20000	L
H	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 4: 96-Well-Platte, Kristallviolett-Färbeversuch

Schematische Darstellung: Die Buchstaben entsprechen den 8 Spalten, die Zahlen bezeichnen die Zeilen (beides blau unterlegt). In der gesamten Zeile A und H sowie in der Spalte 1 und 12 steht das „L“ für Leerwerte. In diesen Wells befindet sich nur Medium ohne Zellen (der Mittelwert dieser Leerwerte wird anschließend von den Extinktionswerten der mit Zellen beschickten Wells abgezogen). In den grün unterlegten Feldern steht die in 100µl Medium befindliche Zellzahl.

Zellproliferationsassays

Die Zellproliferationsassays wurden mit 96-Well-Platten durchgeführt.

Üblicherweise wurden 1.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt.

Zur Messung der Zelldichte und damit des Proliferationsverhaltens der Zellen in den Wells, z.B. nach Behandlung mit den Medikamenten, wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt (s. u. 2.2.1).

2.2.2) Versuch zur Zeitabhängigkeit der Medikamentenwirkung

Ziel dieser Versuche war es, herauszufinden, wann die Medikamente ihre maximal hemmende Wirkung auf die Zellproliferation entwickeln und ob es einen Einfluss der Medikamentenkonzentration auf diesen Zeitpunkt gibt.

Die Extinktion wurde nach zwei, vier, sechs und acht Tagen Inkubation mit den beiden Medikamenten bestimmt, so dass bei der Aussaat der Zellen pro Medikament und pro Zellreihe insgesamt vier 96 Wellplatten benutzt wurden.

Die grün gefärbten Wells wurden mit je 100µl Kulturmedium versehen (Leerwert). In den gelben Wells wurden jeweils 1000 Zellen SKOV-3 oder BG-1 mit 100µl Kulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation der Zellen in den Wells mit den hier dargestellten Konzentrationen von Flavopiridol oder Celecoxib gelöst in 100µl Kulturmedium bzw. für die Kontrolle mit 0,1% DMSO gelöst in 100µl Kulturmedium. Nach zwei, vier, sechs und acht Tagen Inkubationszeit mit Flavopiridol bzw. Celecoxib erfolgte eine Anfärbung der Platten mit Kristallviolett zur Bestimmung der Zelldichte. Am vierten Inkubationstag wurde ein Medium-Wechsel durchgeführt.

Zur Veranschaulichung hier eine schematische Darstellung der 96-Well-Platten, beschriftet mit den entsprechenden Konzentrationen für Flavopiridol und Celecoxib:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B	L	Kontrolle	0,1nM	0,1nM	1nM	1nM	10nM	10nM	0,1µM	0,1µM	1µM	L
C	L	Kontrolle	0,1nM	0,1nM	1nM	1nM	10nM	10nM	0,1µM	0,1µM	1µM	L
D	L	Kontrolle	0,1nM	0,1nM	1nM	1nM	10nM	10nM	0,1µM	0,1µM	1µM	L
E	L	Kontrolle	0,1nM	0,1nM	1nM	1nM	10nM	10nM	0,1µM	0,1µM	1µM	L
F	L	Kontrolle	0,1nM	0,1nM	1nM	1nM	10nM	10nM	0,1µM	0,1µM	1µM	L
G	L	Kontrolle	0,1nM	0,1nM	1nM	1nM	10nM	10nM	0,1µM	0,1µM	1µM	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 5: 96-Well-Platte, Flavopiridol, Versuche zur Zeitabhängigkeit

Schematische Darstellung, insgesamt pro Versuch vier Platten, Bebrütung für 48, 96, 144 und 192 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B	L	Kontrolle	Kontrolle	0,1µM	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	50µM	50µM	L
C	L	Kontrolle	Kontrolle	0,1µM	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	50µM	50µM	L
D	L	Kontrolle	Kontrolle	0,1µM	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	50µM	50µM	L
E	L	Kontrolle	Kontrolle	0,1µM	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	50µM	50µM	L
F	L	Kontrolle	Kontrolle	0,1µM	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	50µM	50µM	L
G	L	Kontrolle	Kontrolle	0,1µM	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	50µM	50µM	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 6: 96-Well-Platte, Celecoxib, Versuche zur Zeitabhängigkeit

Schematische Darstellung, insgesamt pro Versuch vier Platten, Bebrütung für 48, 96, 144 und 192 Stunden

2.2.3) Konzentrationsversuche

Die Zelllinien wurden mit Celecoxib oder mit Flavopiridol in unterschiedlichen Konzentrationen für einen Zeitraum von 96 Stunden inkubiert.

Dazu wurden die Zellen mit der Dichte von 1000 Zellen / 100µl Kulturmedium / Well ausgesät. Nach 24 Stunden begann die 48stündige Inkubation mit den verschiedenen Medikamentenkonzentrationen, jeweils gelöst in 100µl Kulturmedium.

Abschließend wurde die Konzentration der vitalen Zellen nach Anfärbung mit Kristallviolett photometrisch bestimmt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B	L	Kontrolle	0,1nM	1nM	10nM	30nM	60nM	0,1µM	0,3µM	0,6µM	1µM	L
C	L	Kontrolle	0,1nM	1nM	10nM	30nM	60nM	0,1µM	0,3µM	0,6µM	1µM	L
D	L	Kontrolle	0,1nM	1nM	10nM	30nM	60nM	0,1µM	0,3µM	0,6µM	1µM	L
E	L	Kontrolle	0,1nM	1nM	10nM	30nM	60nM	0,1µM	0,3µM	0,6µM	1µM	L
F	L	Kontrolle	0,1nM	1nM	10nM	30nM	60nM	0,1µM	0,3µM	0,6µM	1µM	L
G	L	Kontrolle	0,1nM	1nM	10nM	30nM	60nM	0,1µM	0,3µM	0,6µM	1µM	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 7: 96-Well-Platte, Flavopiridol, Konzentrationsversuche

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B	L	Kontrolle	10nM	0,1µM	0,5µM	1µM	3µM	6µM	10µM	25µM	50µM	L
C	L	Kontrolle	10nM	0,1µM	0,5µM	1µM	3µM	6µM	10µM	25µM	50µM	L
D	L	Kontrolle	10nM	0,1µM	0,5µM	1µM	3µM	6µM	10µM	25µM	50µM	L
E	L	Kontrolle	10nM	0,1µM	0,5µM	1µM	3µM	6µM	10µM	25µM	50µM	L
F	L	Kontrolle	10nM	0,1µM	0,5µM	1µM	3µM	6µM	10µM	25µM	50µM	L
G	L	Kontrolle	10nM	0,1µM	0,5µM	1µM	3µM	6µM	10µM	25µM	50µM	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 8: 96-Well-Platte, Celecoxib, Konzentrationsversuche

2.2.4) Synergismus-Versuche

Anhand der Ergebnisse der vorangegangenen Versuche wurden Konzentrationen der beiden Substanzen für die Untersuchung auf synergistische Effekte ausgewählt. Die Inkubationszeit betrug vier Tage.

Pro Substanz wurden je drei Grundkonzentrationen ausgewählt, die dann mit aufsteigenden Konzentrationen der anderen Substanz den Zellen zugefügt wurden.

Zur Veranschaulichung des komplexen Versuchsaufbau erfolgt eine schematische Darstellung, hierbei steht C für Celecoxib und F für Flavopiridol.

Behandlung mit drei verschiedenen Grundkonzentrationen an Flavopiridol und Celecoxib in aufsteigenden Konzentrationen

Die Zellen sollen mit drei Grundkonzentrationen Flavopiridol versehen werden. Um die Wirkung des in aufsteigenden Konzentrationen aufgetragenen Celecoxibs allein zu untersuchen, wurde (a) als „Kontrollplatte“ nur mit Celecoxib behandelt.

Die zweite Spalte der 96 Well-Platte stellt die „absolute“ Kontrolle dar, hier werden die Zellen nur mit DMSO 0,5%ig versetzt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B bis G	L	Kontrolle, 0,5% DMSO	F: 0µM + C: 0	F: 0µM + C: 0,3µM	F: 0µM + C: 0,6µM	F: 0µM + C: 1µM	F: 0µM + C: 3µM	F: 0µM + C: 6µM	F: 0µM + C: 10µM	F: 0µM + C: 25µM	F: 0µM + C: 50µM	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 9: Synergismus-Versuch.

a) Kein Flavopiridol, Celecoxib in aufsteigenden Konzentrationen

In Abbildung 10 werden mit Ausnahme der zweiten Spalte alle Wells mit der Grundkonzentrationen 10nM Flavopiridol inkubiert, die zweite Spalte als Kontrolle bleibt gegenüber (a) unverändert. Die dritte Spalte wird zur Kontrolle der Flavopiridol Wirkung allein. Die Wirkung beider Medikamente zusammen auf die Zelllinien, kann man von Spalte vier bis elf beobachten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B bis G	L	Kontrolle, 0,5% DMSO	F: 10nM + C: 0	F: 10nM + C: 0,3µM	F: 10nM + C: 0,6µM	F: 10nM + C: 1µM	F: 10nM + C: 3µM	F: 10nM + C: 6µM	F: 10nM + C: 10µM	F: 10nM + C: 25µM	F: 10nM + C: 50µM	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 10: Synergismus-Versuch.

b) Flavopiridol 10nM, Celecoxib in aufsteigenden Konzentrationen

In der folgenden Abbildung 11 hat sich lediglich die Grundkonzentration von Spalte drei bis elf verändert (jetzt 30nM Flavopiridol). Ansonsten besteht das gleiche Setting wie in (b).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B bis G	L	Kontrolle, 0,5% DMSO	F: 30nM + C: 0	F: 30nM + C: 0,3µM	F: 30nM + C: 0,6µM	F: 30nM + C: 1µM	F: 30nM + C: 3µM	F: 30nM + C: 6µM	F: 30nM + C: 10µM	F: 30nM + C: 25µM	F: 30nM + C: 50µM	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 11: Synergismus-Versuch.

c) Flavopiridol 30nM, Celecoxib in aufsteigenden Konzentrationen

In Abbildung 12 ist die Behandlung mit der höchsten Grundkonzentration an Flavopiridol (60nM) schematisch dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B bis G	L	Kontrolle, 0,5% DMSO	F: 60nM + C: 0	F: 60nM + C: 0,3µM	F: 60nM + C: 0,6µM	F: 60nM + C: 1µM	F: 60nM + C: 3µM	F: 60nM + C: 6µM	F: 60nM + C: 10µM	F: 60nM + C: 25µM	F: 60nM + C: 50µM	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 12: Synergismus-Versuch.

d) Flavopiridol 60nM, Celecoxib in aufsteigenden Konzentrationen

Behandlung mit drei verschiedenen Grundkonzentrationen an Celecoxib und Flavopiridol in aufsteigenden Konzentrationen

Hier wird Celecoxib in drei verschiedenen Grundkonzentrationen verwendet, und Flavopiridol wird in aufsteigenden Konzentrationen hinzugegeben in Analogie zu den Abbildungen 9-12.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B bis G	L	Kontrolle, 0,5% DMSO	C: 0 μ M + F: 0	C: 0 μ M + F: 1nM	C: 0 μ M + F: 10nM	C: 0 μ M + F: 30nM	C: 0 μ M + F: 60nM	C: 0 μ M + F: 0,1 μ M	C: 0 μ M + F: 0,3 μ M	C: 0 μ M + F: 0,6 μ M	C: 0 μ M + F: 1 μ M	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 13: Synergismus-Versuch.

e) Kein Celecoxib, Flavopiridol in aufsteigenden Konzentrationen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B bis G	L	Kontrolle, 0,5% DMSO	C: 10 μ M + F: 0	C: 10 μ M + F: 1nM	C: 10 μ M + F: 10nM	C: 10 μ M + F: 30nM	C: 10 μ M + F: 60nM	C: 10 μ M + F: 0,1 μ M	C: 10 μ M + F: 0,3 μ M	C: 10 μ M + F: 0,6 μ M	C: 10 μ M + F: 1 μ M	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 14: Synergismus-Versuch.

f) Celecoxib 10 μ M, Flavopiridol in aufsteigenden Konzentrationen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B bis G	L	Kontrolle, 0,5% DMSO	C: 25 μ M + F: 0	C: 25 μ M + F: 1nM	C: 25 μ M + F: 10nM	C: 25 μ M + F: 30nM	C: 25 μ M + F: 60nM	C: 25 μ M + F: 0,1 μ M	C: 25 μ M + F: 0,3 μ M	C: 25 μ M + F: 0,6 μ M	C: 25 μ M + F: 1 μ M	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 15: Synergismus-Versuch.

g) Celecoxib 25 μ M, Flavopiridol in aufsteigenden Konzentrationen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
B bis G	L	Kontrolle, 0,5% DMSO	C: 50 μ M + F: 0	C: 50 μ M + F: 1nM	C: 50 μ M + F: 10nM	C: 50 μ M + F: 30nM	C: 50 μ M + F: 60nM	C: 50 μ M + F: 0,1 μ M	C: 50 μ M + F: 0,3 μ M	C: 50 μ M + F: 0,6 μ M	C: 50 μ M + F: 1 μ M	L
H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Abbildung 16: Synergismus-Versuch.

h) Celecoxib 50 μ M, Flavopiridol in aufsteigenden Konzentrationen

2.2.5) Zellzyklusanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, mit dem einzelne Zellen in einer Suspension analysiert werden können anhand ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Hieraus kann man Rückschlüsse ziehen, in welcher Phase des Zellzyklus sich eine einzelne Zelle im Moment der Fixierung befand. Hier lautete die Fragestellung, ob die mit Medikamenten behandelten Zellen sich anders auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus verteilen als nicht behandelte.

Was ist Durchflusszytometrie/FACS?

Der Ausdruck "FACS" ist ein registriertes Markenzeichen der Firma Becton-Dickinson und steht für Fluorescence Activated Cell Sorting. Bei diesem Verfahren fließen Zellen in einer Suspension hintereinander durch eine Flusszelle (=dünne Messkammer aus Glas) und werden währenddessen durch einen Laserstrahl untersucht.

Das FACS-Gerät misst das Streulicht einer Zelle, welches entsteht, wenn die Zelle den Laserstrahl kreuzt. Je größer eine Zelle ist und je struktureicher in ihrem Inneren, umso mehr Streulicht verursacht sie. Das Streulicht entsteht in alle möglichen Richtungen. Ein FACS-Gerät misst normalerweise das Vorwärtsstreulicht und das Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter) macht in erster Linie eine Aussage über die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) ist stärker vom Inhalt der Zelle beeinflusst, es macht eine Aussage über die Granularität einer Zelle. Die Signale werden mittels Photomultiplier verstärkt, gemessen und zur Auswertung auf einen Rechner übertragen, der die Ereignisse in Form eines Dot-Plot-Diagrammes darstellt.

Eine weitere Fähigkeit, die ein FACS-Gerät auszeichnet, ist die Messung des Fluoreszenzlichts. Die zu untersuchenden Zellen werden oft mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der aufleuchtet, wenn er mit einer Lichtquelle oder Laser bestrahlt wird (hier Propidiumiodid).

Diese Emissionen werden vom FACS-Gerät detektiert.

Hier ist zunächst ein Dot-Plot-Diagramm mit dem dazugehörigen Histogramm abgebildet. Jeder Dot (Punkt) entspricht einem gemessenen Ereignis der Flowcytometrie, im Optimal-Fall entspricht es einer ausgewerteten Zelle. Bei der Fixierung der Zellen entstehen aber nicht nur einzelne Zellen sondern auch Dubletten, Tripletten, Zellschrott usw. Die Auswertung dieser Zellen würde zu falschen Ergebnissen führen, da eine Dublette von vorneherein den doppelten DNA-Gehalt aufweist. Um diese Dubletten, Tripletten etc. zu diskriminieren, wird im Dot-Plot-Diagramm eine Gate (Tor) gesetzt. Ausgewertet werden dann nur die Ereignisse innerhalb des Gates.

Die X- Achse des Dot-Plot-Diagrammes entspricht der Fläche des Signals, die Y-Achse der Breite des Signals.

Daneben befindet sich das Histogramm, was die einzelnen Ereignisse des Gates schon nach ihrer Größe auswertet. Hier wurden die Grenzen für die Phasen mit Hilfe des Computers (Mouse) festgelegt.

Das Gate (R1) im Dot-Plot (links) und die Phasen im Histogramm (rechts) wurden immer an der Kontrolle (unbehandelte Zellen) festgelegt und dann für die Graphiken der weiteren Versuche übernommen.

Pro Versuch wurden 10.000 innerhalb des Gates liegende Ereignisse ausgewertet.

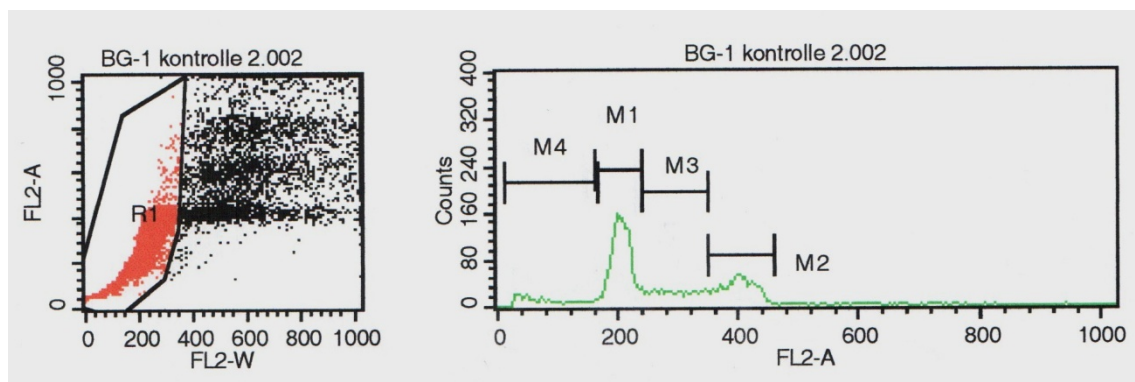


Abbildung 17: Unbehandelte BG-1-Zellen und ihre Verteilung auf den Zellzyklus

M1= G_{1/0}-Phase; M2= G₂/M-Phase; M3= S-Phase → die Abgrenzung zwischen der S- und der G₂/M-Phase ist oft schwierig. Es ist üblich S- und G₂/M-Phase zum sogenannten Proliferationsindex zu addieren.

M4= prä-G_{1/0}-Peak, entspricht apoptotischen und nekrotischen Zellen.

Vorbereitung der Zellen für die Bestimmung der Zellzyklusphasen:

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, mit einer Zelldichte von 200.000 Zellen pro Well gelöst in 2 ml Medium. Die Medikamente wurden 24 Stunden später hinzugegeben, diesmal wurden unterschiedliche Konzentrationen für die beiden Zelllinien benutzt.

Tabelle 1: Verwendete Konzentrationen Flavopiridol (F) und Celecoxib (C) bei der FACS-Analyse

Für SKOV-3-Zellen	Für BG-1-Zellen
Kontrolle: 1,9998ml Medium + 2µlDMSO	Kontrolle: 1,9998ml Medium + 2µlDMSO
C: 25 µM + F: 0 µM	C: 25 µM + F: 0 µM
C: 50 µM + F: 0 µM	C: 50 µM + F: 0 µM
C: 25 µM + F: 0,5 µM	C: 25 µM + F: 0,1 µM
C: 50 µM + F: 0,25 µM	C: 50 µM + F: 0,03 µM
C: 0 µM + F: 0,25 µM	C: 0 µM + F: 0,03 µM
C: 0 µM + F: 0,5 µM	C: 0 µM + F: 0,1 µM

Nach zwei Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet. Nach Überführung in ein 15ml Falconröhrchen wurden sie zentrifugiert (10min bei 1100U/min). Der Überstand wurde abgenommen und 2 ml Waschpuffer pro Falconröhrchen hinzugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren (1500U/min) wurde, nach Abnahme des Überstandes, tropfenweise eiskalter Ethanol hinzugefügt unter ständigem Vortexen.

Die so fixierten Zellen wurden zwölf Stunden bei 4°C aufbewahrt und am nächsten Tag erneut einem Waschschrift unterzogen, bevor die Zugabe von 100µl RNase Stammlösung und erneutes Vortexen erfolgte. Diese Lösung wurde dann 30min bei 37°C inkubiert. Dann begann die Färbung mit Propidiumiodid, wobei jedem Zentrifugen-Röhrchen 1ml Waschpuffer und 10µl Propidiumiodid zugefügt wurden. Die Proben wurden weitere 30min lichtgeschützt inkubiert, bevor die Messung am FACS-Calibur-Gerät begann.

Propidium besitzt die Eigenschaft mit DNA zu interkalieren. Die so angefärbten Zellen werden im Fluoreszenzkanal des FACS-Caliburgerätes erfasst. Gibt man – wie hier der Fall – Propidiumiodid im Überschuß zu den Proben hinzu, dann besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem DNA-Gehalt der Zellen und der Fluoreszenzintensität, die sie ausstrahlt.

Zur Auswertung wurde die Software Cellquest Pro (BD) verwendet.

Insgesamt wurden pro Probe 10.000 Ereignisse ausgewertet.

2.2.6) Unterscheidung Apoptose / Nekrose mit dem Annexinversuch

Dieser Versuch ermöglicht es, nekrotische von apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Die Fragestellung war hier, ob die verwendeten Medikamente in der Lage sind, in den bösartigen Zellen Apoptose zu induzieren.

Zur Auswertung wurde ebenfalls das FACS-Calibur-Gerät verwendet.

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte bis zur Ernte der Zellen analog zur Zellzyklusanalyse. Hierbei wurde zunächst das Medium der Zellen und nach Trypsinlösung auch die Zellen in 5er Falconröhrchen überführt. Dann wurde zentrifugiert (5min bei 1100U/min) und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 1ml Medium wurden die Falconröhrchen gevortext, bis sich das Zellpellet vom Boden löste. Diese Suspension wurde in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (5min bei 1100U/min). Nach Abgießen des Überstandes begann die eigentliche Färbung mit Annexin und Propidium: Jede Probe wurde mit 48µl Inkubationspuffer, 1µl Annexin und 1µl Propidiumiodid versehen und 15 minutenlang bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Direkt nach Ablauf der 15 Minuten begann die Messung am FACS-Calibur-Gerät.

Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass apoptotische und nekrotische Zellen auf der Zelloberfläche vermehrt Phosphatidylserine exprimieren. Annexin-V ist ein Calcium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserinen. So werden apoptotische und nekrotische Zellen von Annexin-V-Fluorescein angefärbt. Die Differenzierung von nekrotischen und apoptotischen Zellen erfolgt durch Färbung mit Propidiumiodid, das nur mit der DNA von nekrotischen Zellen interkaliert und nur diese anfärbt. Durch Einstellung des FACS-Calibur entsprechend der Fluoreszenzcharakteristika der beiden Substanzen kann man nekrotische von apoptotischen Zellen unterscheiden. Auch hier wurde mit der Software Cellquest Pro gearbeitet und jeweils 10.000 Ereignisse pro Probe ausgewertet.

Zur Veranschaulichung die Computer-gestützte Auswertung von unbehandelten BG-1-Zellen nach der Anfärbung mit dem Annexin-Kit:

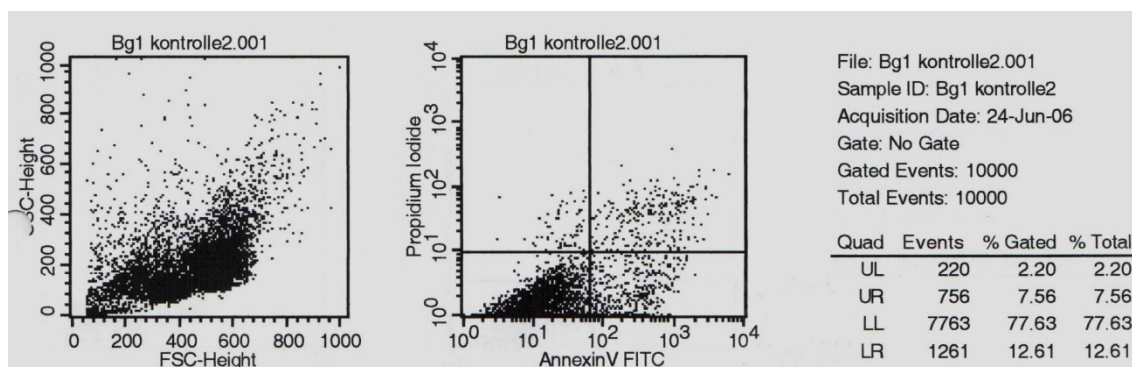


Abbildung 18

Alle Ereignisse sind von Bedeutung, es wird kein Gate gesetzt (links im Dot-Plot).

Im Diagramm rechts werden die Ereignisse nach ihrem Färbeverhalten beurteilt.

Die X-Achse entspricht der Anfärbung mit Annexin V, die Y-Achse der Anfärbung mit Propidium-Iodid.

Die vier Quadranten entsprechen:

LL, links unten: Zellen, die sich weder mit Annexin noch mit PI anfärben → vitale Zellen

LR, rechts unten: Zellen, die sich nur mit Annexin anfärben → apoptotische Zellen

UL, links oben: Zellen, die sich nur mit PI anfärben → aufgelöste Zellen, spätes Stadium des Zelltods oder der Nekrose.

UR, rechts oben: Zellen, die sich mit PI und Annexin anfärben → nekrotische Zellen.

Zur Auswertung kann man die beiden oberen Quadranten, die dem frühen und späten Nekrose-Stadium entsprechen, auch zusammenfassen.

2.2.7) Western Blots

1) Protein-Isolierung:

Die Aussaat der Zellen erfolgte für jede zu untersuchende Probe in kleine Gewebekulturflaschen mit je 1×10^7 Zellen, die dann nach 24 Stunden mit dem jeweiligen Medikament oder Kontrollmedium inkubiert wurden und zwar in folgenden Konzentrationen:

Tabelle 2: Konzentrationen von Flavopiridol und Celecoxib bei den Western Blots

Für BG-1-Zellen	Für SKOV-3-Zellen
1) Kontrolle	1) Kontrolle
2) Flavopiridol 0,03 μ M	2) Flavopiridol 0,25 μ M
3) Flavopiridol 0,1 μ M	3) Flavopiridol 0,5 μ M
4) Celecoxib 25 μ M	4) Celecoxib 25 μ M
5) Celecoxib 50 μ M	5) Celecoxib 50 μ M
6) Flavopiridol 0,03 μ M + Celecoxib 50 μ M	6) Flavopiridol 0,25 μ M + Celecoxib 50 μ M
7) Flavopiridol 0,1 μ M + Celecoxib 25 μ M	7) Flavopiridol 0,5 μ M + Celecoxib 25 μ M

Nach zweitägiger Inkubationszeit wurden die Zellen nach Trypsin-Behandlung geerntet und dann in 15ml Falkonröhrchen überführt. Diese wurden zentrifugiert und es folgten zwei Waschschrte mit je 5ml PBS und Zentrifugation bei 1600U/min. Danach wurden zu jedem Zellpellet 1ml Lysis-Puffer hinzugegeben, erneut gevortext und dann 30min auf Eis inkubiert. Danach wurde noch einmal bei 4°C mit 1300U/min zentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren.

2) Proteingehaltbestimmung der einzelnen Lysate

Die Proteingehaltbestimmung der einzelnen Proben erfolgte mit dem Micro BCA Protein Assay Reagent Kit, die Durchführung folgte der entsprechenden Anleitung. Chemische Grundlage dieses Verfahrens ist die Fähigkeit von BCA (Bicinchoninic Acid) Cu^{1+} -Ionen zu detektieren. Letztere entstehen im alkalischen Milieu wenn Cu^{2+} durch Anwesenheit von Protein reduziert wird. Zwei BCA-Moleküle bilden gemeinsam mit einem Cu^{1+} ein Chelatkomplex, der eine starke Absorption bei 560nm zeigt. Diese ist linear zum Proteingehalt der Probe und kann photometrisch bestimmt werden. Im Versuch wird die

Gesamtproteinmenge einer unbekannten Probe ermittelt im Vergleich mit einer Standardeckurve von Proben mit vorher bekannter Proteinmenge.

3) Gele gießen für den SDS-Page

Man unterscheidet Trenn- und Sammelgel, wobei im Trenngel die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Größe stattfindet, wohingegen vom Sammelgel aus die Proteinwanderung startet.

Zuerst wurden mindestens 10 ml Trenngel vorbereitet (s. auch Materialien), wobei APS und TEMED als letztes hinzugegeben wurden, damit das Gel nicht gleich polymerisieren konnte. Dieses wurde dann möglichst luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand der Kammer. Das Trenngel polymerisierte dann 30 min bei RT, nachdem es zuvor noch mit Ethanol überschichtet worden war. In der Zwischenzeit wurden mindestens 4ml Sammelgel vorbereitet (s. Material). Nach Ablauf der 30min Polymerisationszeit wurde dieses auf das Trenngel gegossen und der Kamm zur Bildung der Kammern als Startpunkt für die Proteinwanderung eingesetzt. Nach abermaligem Abwarten von 30min zur Polymerisation wurde das Gel mit der Gelkammer in die Elektrophoresekammer gesetzt. Deren Tanks waren mit 1xLämmli-Puffer gefüllt, wobei das Sammelgel mit dem Puffer Kontakt haben muss. Vor der Beladung der Taschen mit den Proteinen wurde der Kamm gezogen.

4) Vorbereitung der Proben auf den SDS-Page

Für jede zu untersuchende Probe wurden 20µg Protein benötigt, so dass - in Abhängigkeit von den Ergebnissen der Proteingehaltsbestimmung der einzelnen Proben - $x \mu\text{l}$ Lösung mit $y \mu\text{l}$ PBS versehen wurden, so dass $x \mu\text{l} + y \mu\text{l} = 15 \mu\text{l}$ ergaben, um eine gleichmäßige Ladung der Slots zu gewährleisten. Des Weiteren wurden noch 5µl Loading Puffer pro Probe hinzugefügt. Im Ansatz herrschten reduzierende Bedingungen, da ein Loading Puffer mit 2-Mercapto-Ethanol-Zusatz verwendet wurde, dies führt zum Aufbrechen von Disulfidbrücken innerhalb der Proteine.

Die Proben wurden 5 minutenlang bei 95°C im Thermoblock erhitzt.

4) Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde mit Hilfe des SDS-Page durchgeführt.

PAGE steht für Polyacrylamid Gel Elektrophorese und ist die am häufigsten verwendete Technik zur Trennung von Proteinen. Die Porengröße eines Gels wird bestimmt durch das

Verhältnis von Bisacrylamiden zu Acrylamiden und durch die Konzentration an Acrylamiden.

SDS steht für Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat). Hierbei handelt es sich um ein amphipathisches Lösungsmittel, ein Molekül mit einem anionischen Kopf und einem lipophilen Schwanz. SDS bindet Proteine nicht-kovalent. Sie übertragen negative Ladungen auf die Proteine und maskieren dadurch deren natürliche Ladung. Das heißt, dass während der Gelelektrophorese alle Proteine zur Anode wandern und dass die Migration der Proteine beim SDS-Page nicht durch die Ladung der Proteine sondern durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird (59).

Jeder Slot (Tasche) wurde mit 20µl Lösung der vorbereiteten Proben beschickt.

Der erste Slot wurde mit 5µl eines standardisierten Markers beladen (Biotinylated Protein-ladder). Bei diesem Marker handelt es sich um gereinigte biotinierte Proteinproben von unterschiedlichem, aber genau definierten molekularem Gewicht. Das Proteingemisch trennt sich auf in Gruppen von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 140 und 200 kDa. Der Marker dient später als Orientierungshilfe.

An die Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 110 Volt angelegt. Der Gel-Lauf wurde durchgeführt bis die Front ca. 0,5cm vom Boden des Gels entfernt war, was in etwa eine Stunde dauerte.

Nach dem Gel-Lauf wurde das Gel vorsichtig von der Glasplatte entfernt.

5) Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran / Blotting-Prinzip:

Beim Blotting wird ein elektrisches Feld angelegt, das senkrecht zum Polyacrylamid-Gel ausgerichtet ist. Dadurch wandern die Proteine von dem Gel aus auf eine Membran zu, in der sie aufgrund elektrostatischer Kräfte „hängenbleiben“. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße bleibt so erhalten, aber die Detektion mittels Antikörper wird erheblich erleichtert.

Durchführung:

Die Nitrozellulosemembran wurde entsprechend der Gelgröße zugeschnitten (Mini-Gele: 6,4cm x 8,2cm). Dazu passend mussten insgesamt vier Blotting Paper zugeschnitten werden, von denen zwei unter die Membran auf die Anode und zwei über die Membran auf das Gel mit Kontakt zur Kathode gelegt wurden.

Vor dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden die Membran und vier Blotting-Paper in Semi-Dry-Blot-Puffer pH 8,3 (= Towbin-Puffer) eingeweicht.

Dann wurde das Gel vorsichtig auf die Nitrocellulosemembran übertragen und das klassische Sandwich aufgebaut, bestehend aus (von unten nach oben):

Anode, zwei Blottingpaper, Nitrocellulosemembran, Gel, zwei Blottingpaper, Kathode.

Der Transfer erfolgte bei 290mA mit 10Volt konstant über 45min.

Danach wurde mit der Ponceau-Rot-Färbung der Erfolg des Proteintransfers überprüft. Dies kann man direkt an einer Rotfärbung der Proteinbanden erkennen. Nach mehrmaligem Spülen mit Aquadest wurde die Membran über Nacht in Blocking-Puffer inkubiert (5% Dry Milk in PBS), um unspezifische Bindungsstellen der Proteine zu blockieren.

6) Antikörperbindung und Belichtung:

Nach dem Blocken wurde die Membran dreimal fünf Minuten in PBS mit 0,05% Tween gewaschen.

Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (in entsprechender Verdünnung) in 5% dry milk in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran wieder dreimal fünf Minuten mit PBS + 0,05% Tween20 gewaschen.

Da als Marker ein Biotinylated Protein Ladder verwendet wurde, wurde fünf Minuten vor Zugabe des 2. Antikörpers der für den Marker spezifische Antikörper Anti-Biotin-HRP-gekoppelter Antikörper (Verdünnung 1:1000) hinzugefügt.

Die Inkubation mit dem 2. Antikörper wurde mit Anti-mouse/rabbit-IgG-POD in einer Verdünnung von 1:5000 in 5% dry milk in PBS + 0,05% Tween 20 durchgeführt und zwar 60 min bei RT. Danach wurde die Membran nochmals mit PBS gewaschen.

Folgende Antikörper wurden als Primärantikörper verwendet:

- Anti- β -Aktin
- Anti-pan-RAS
- Anti-AKT.

Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde ein Verfahren der Chemolumineszenz benutzt. Die Chemolumineszenz-Reaktion wurde mit dem ECL Western Blotting detection reagent and analysis system von Amersham Biosciences durchgeführt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass Horse-Radish-Peroxidase (abgekürzt POD oder HRP) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Diacylhydraziden wie Luminol katalysiert. Dabei entsteht ein Intermediärprodukt, das Licht emittiert. Da sowohl der 2.-Antikörper als auch der spezifische Antikörper des Markers an POD bzw. HRP gekoppelt sind, wird also an den Bindungsstellen dieser Antikörper auf der Membran diese Reaktion ablaufen und detektiert werden.

Das für die Messung benötigte Chemilumineszenz-Substrat wurde entsprechend der Gebrauchsanleitung unmittelbar vor der Messung gemischt. Es wurden 2ml auf die Membran gegeben und eine Minute im Dunkeln inkubiert.

Danach wurde die Membran im CHEMI DOC XRS von der Firma BIO RAD entwickelt mit entsprechender Einstellung der Software (Chemiluminescence high sensitiv 2x2 Bin in der Software). Die Entwicklungszeit variierte je nach Sekundär-Antikörper:

Anti- β -Aktin: 1min

pan-RAS: 40min

Anti-AKT: 1min, 20min.

3) Ergebnisse

3.1) Anfärbung der Zellen mit Kristallviolett

Zwischen der Zelldichte in einem Well und der im Photometer gemessenen Extinktion besteht im Bereich einer Zelldichte von 1000-6000 Zellen / 100µl Medium eine Proportionalität sowohl für BG-1- als auch für SKOV-3-Zellen. Beide Kurven zeigen die Mittelwerte aus drei Versuchen.

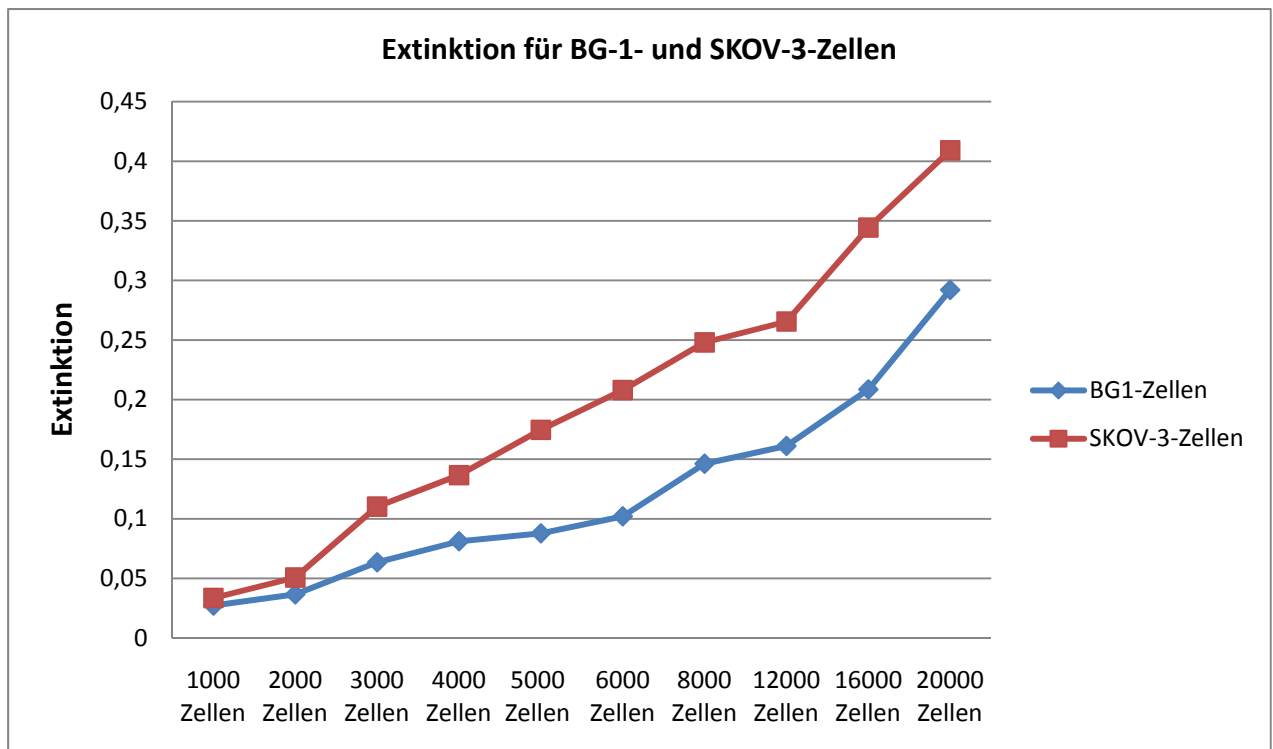


Abbildung 19: Färbung mit Kristallviolett

Lineare Abhängigkeit der Extinktion von mit Kristallviolett angefärbten BG-1- und SKOV-3-Zellen bei Zelldichten zwischen 1000 bis 6000 Zellen. Standardabweichungen für BG-1 < 0,03; für SKOV-3 < 0,069.

3.2) Zeitabhängigkeit der Medikamentenwirkung

3.2.1) Zeitabhängigkeit der Wirkung von Flavopiridol

Die Zellen wurden gemäß der Anleitung unter 2.2.2 und Abbildung 5 behandelt.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen.

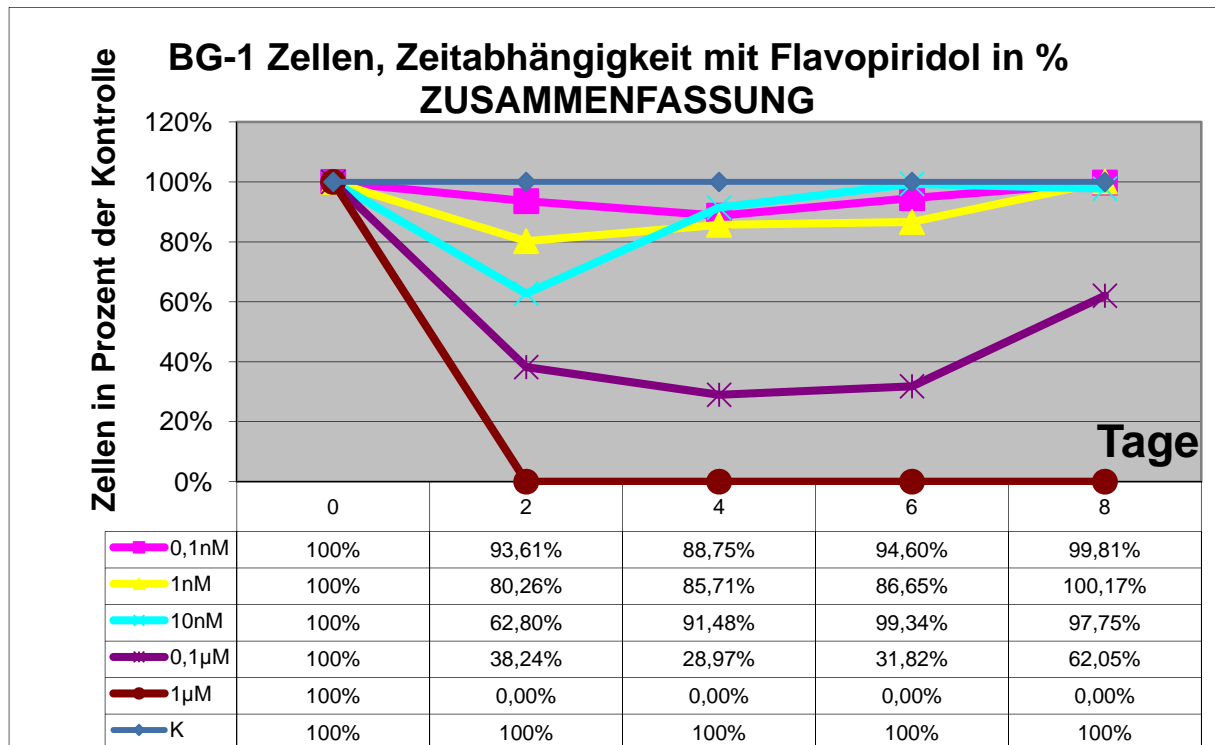


Abbildung 20 : Für BG-1-Zellen, Zeitabhängigkeit mit Flavopiridol

X-Achse: Anzahl der Inkubationstage (0,2,4,6,8). Tag 0 wird =100% gesetzt für alle Konzentrationen.

Dunkelblau: Kontrolle, jeder Tag =100% gesetzt. Die anderen Farben entsprechen den in der Graphik unten aufgeführten Konzentrationen an Flavopiridol.

Für den vierten Tag ergibt sich bei allen Konzentrationen von Flavopiridol ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem P-Wert von $p \leq 0,046$.

Tabelle 3: Standardabweichungen, BG-1-Zellen, Zeitabhängigkeit mit Flavopiridol

Standardabweichungen	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8
0,1 nanomolar	7,06%	8,7%	6,55%	5,38%
1 nanomolar	17,03%	4,84%	11,65%	7,26%
10 nanomolar	18,95%	5,8%	4,99%	7,43%
0,1 mikromolar	11,95%	5,36%	2,85%	12,2%
1 mikromolar	0%	0%	0%	0%

Für die Betrachtung des Proliferationsverhaltens von BG-1-Zellen unter Flavopiridol-Gabe ist bei den hier verwendeten Konzentrationen eine Inkubationszeit von zwei bis vier Tagen interessant. Für den vierten Tag ergibt sich bei allen Konzentrationen von Flavopiridol ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p \leq 0,046$; ermittelt mit dem T-Test für verbundene Stichproben, bei einem vorher festgelegten Vertrauensintervall von 0,95. Die Zellen wurden gemäß der Anleitung unter 2.2.2 und Abbildung 5 behandelt.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen.

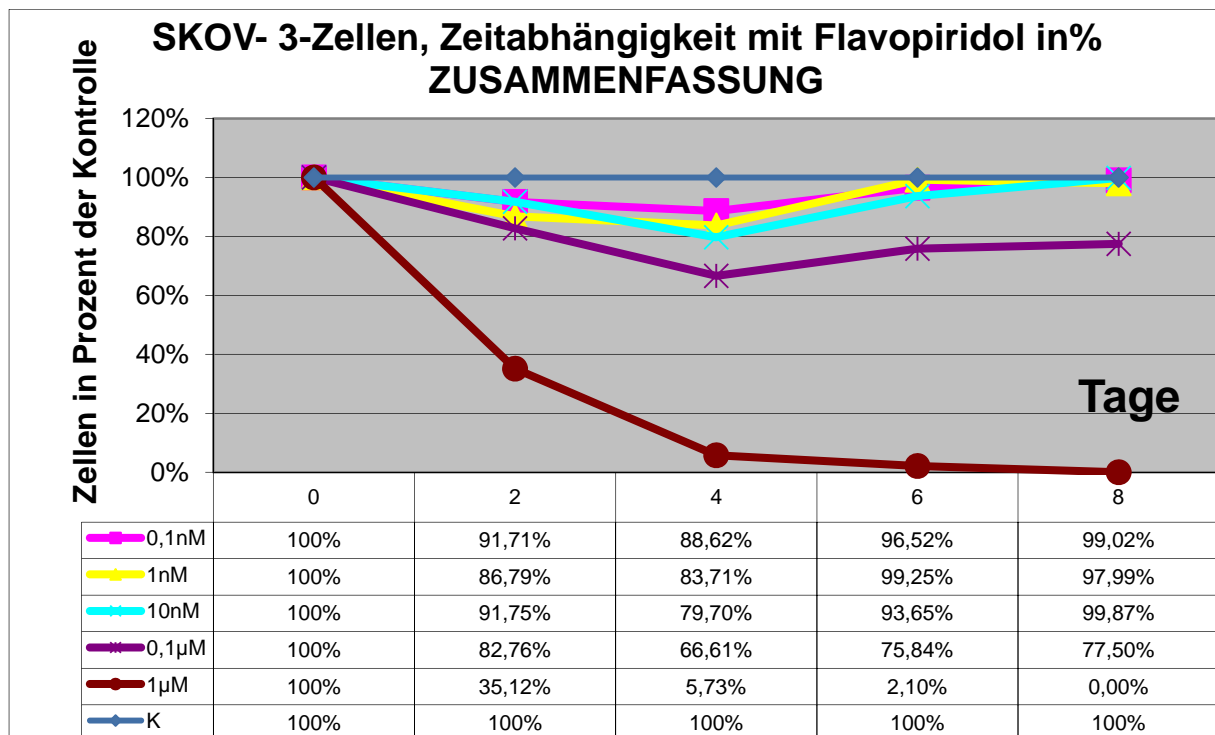


Abbildung 21: Für SKOV-3-Zellen, Zeitabhängigkeit mit Flavopiridol

X-Achse: Anzahl der Inkubationstage (0,2,4,6,8). Tag 0 wird =100% gesetzt für alle Konzentrationen.

Dunkelblau: Kontrolle, jeder Tag =100% gesetzt. Die anderen Farben entsprechen den in der Graphik unten aufgeführten Konzentrationen an Flavopiridol.

Für den vierten Tag ergibt sich bei allen Konzentrationen von Flavopiridol ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p < 0,001$.

Tabelle 4: Standardabweichungen, SKOV-3-Zellen, Zeitabhängigkeit mit Flavopiridol

Standardabweichung	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8
0,1 nanomolar	4,3%	1,64%	1,73%	0,33%
1 nanomolar	3,49%	1,66%	5,12%	0,64%
10 nanomolar	7,01%	3,86%	2,5%	1,67%
0,1 mikromolar	4,51%	4,54%	4,59%	1,97%

Das Wirkungsmaximum für Flavopiridol bei SKOV-3-Zellen tritt nach vier Tagen Inkubationszeit ein.

Für den vierten Tag ergibt sich bei allen Konzentrationen von Flavopiridol ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p < 0,001$; ermittelt mit dem T-Test für verbundene Stichproben, bei einem vorher festgelegten Vertrauensintervall von 0,95.

3.2.2) Zeitabhängigkeit der Wirkung von Celecoxib

Die Zellen wurden behandelt wie beschrieben in 2.2.2 und Abbildung 6.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen.

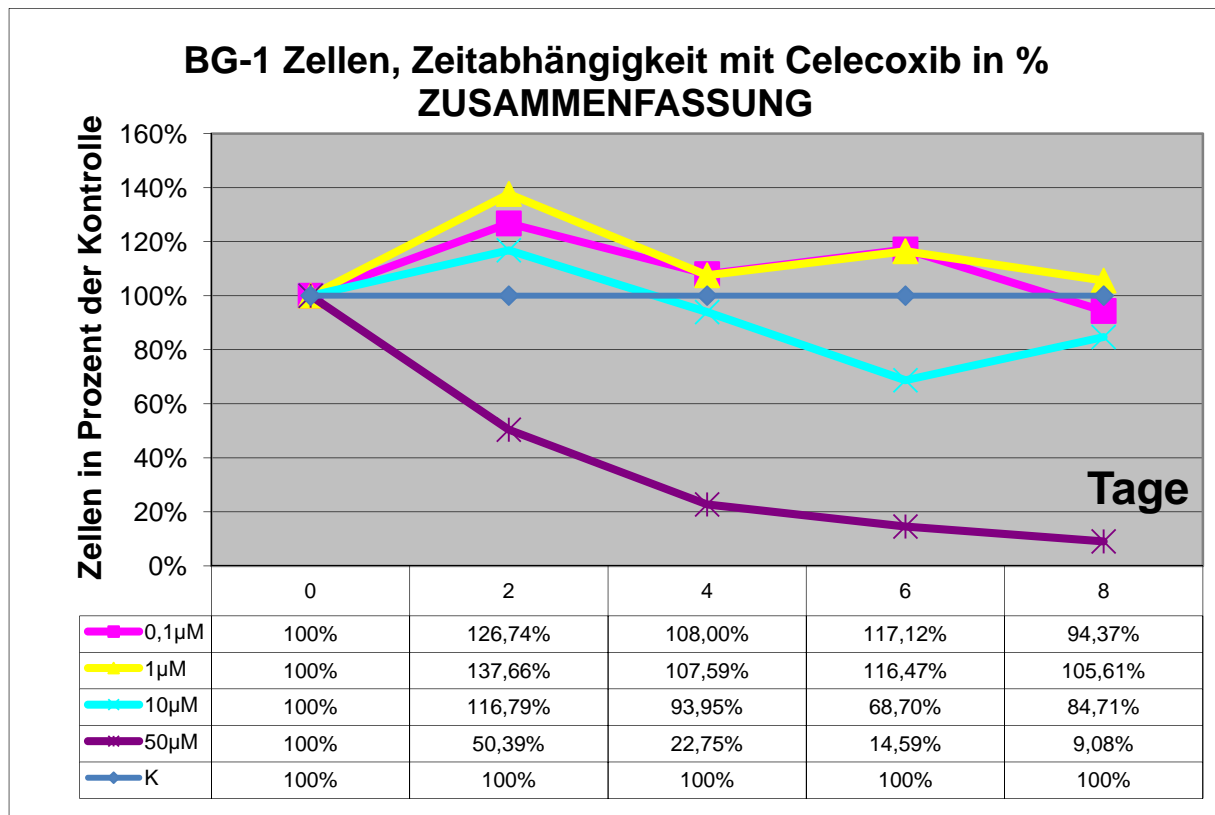


Abbildung 22: BG-1-Zellen, Zeitabhängigkeit Celecoxib

X-Achse: Anzahl der Inkubationstage (0,2,4,6,8). Tag 0 wird =100% gesetzt für alle Konzentrationen.

Dunkelblau: Kontrolle, jeder Tag =100% gesetzt. Die anderen Farben entsprechen den in der Graphik unten aufgeführten Konzentrationen an Celecoxib. Für den vierten Tag ergibt sich zwischen der Kontrolle und der Konzentration Celecoxib 50µM ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p < 0,001$.

Für den sechsten Tag gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied für alle Konzentrationen gegenüber der Kontrolle mit $p < 0,001$.

Tabelle 5: Standardabweichungen, BG-1-Zellen, Zeitabhängigkeit Celecoxib

Standardabweichungen	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8
0,1 µmolar	4,29%	8,78%	10,21%	4,78%
1 µmolar	12,51%	3,88%	7,20%	4,86%
10 µmolar	21,12%	6,11%	18,17%	14,38%
50µmolar	11,34%	18,71%	12,58%	16,48%

Die über die Zeit betrachtet stärksten Effekte liegen nach zwei und vier Tagen Inkubationszeit vor bei Inkubation mit 50µM, mit einer relativen Wachstumshemmung von ~ 50% im Vergleich zu den vorher gemessenen Werten.

In den niedrigen Konzentrationen (0,1 und 1µM) wirkt Celecoxib wachstumsfördernd auf die BG-1-Zellen.

Am vierten Tag findet sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und behandelten Zellen bei Inkubation mit Celecoxib 50µM ($p < 0,001$).

Die Zellen wurden behandelt wie beschrieben unter 2.2.2 und Abbildung 6.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen.

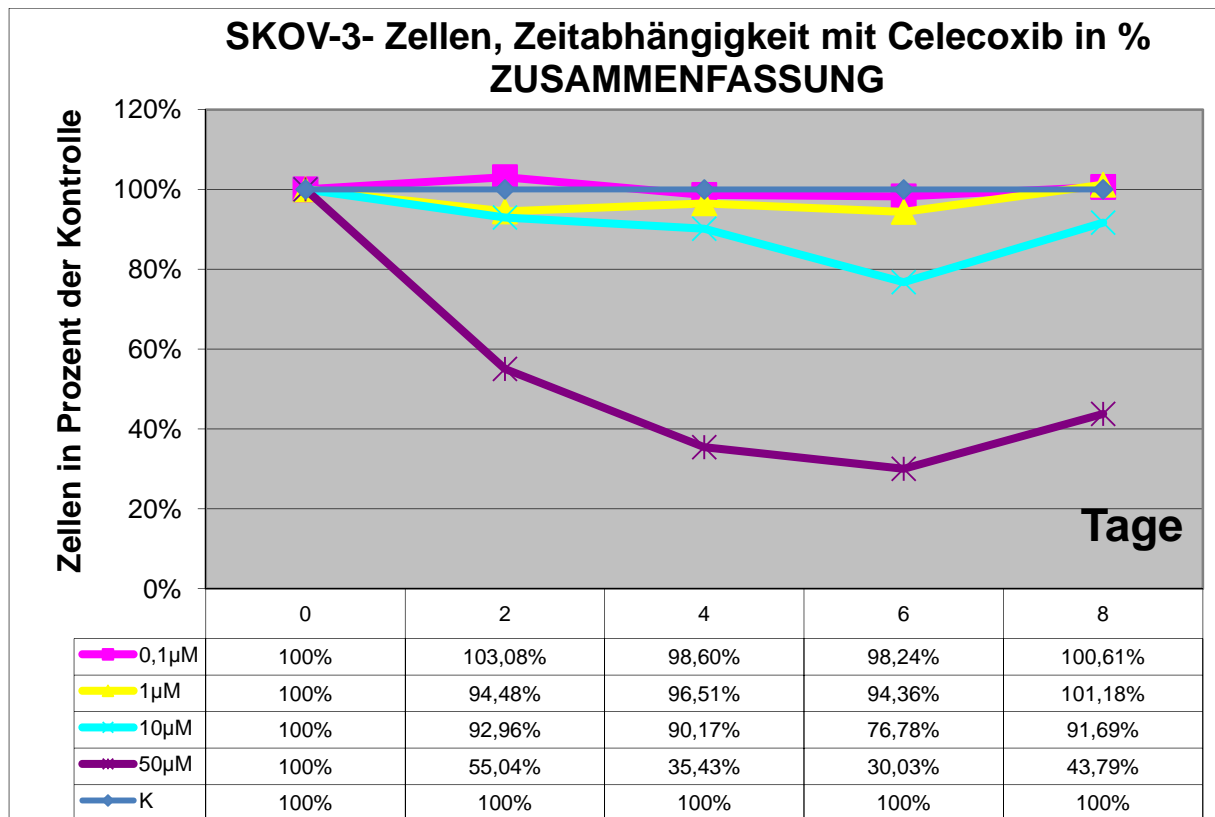


Abbildung 23: SKOV-3-Zellen, Zeitabhängigkeit mit Celecoxib

X-Achse: Anzahl der Inkubationstage (0,2,4,6,8). Tag 0 wird =100% gesetzt für alle Konzentrationen.

Dunkelblau: Kontrolle, jeder Tag =100% gesetzt. Die anderen Farben entsprechen den in der Graphik unten aufgeführten Konzentrationen an Celecoxib.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und behandelten Zellen zeigen sich an Tag zwei, vier, sechs und acht bei Inkubation mit Celecoxib 50µM mit einem p-Wert von $p < 0,001$.

Tabelle 6: Standardabweichungen, SKOV-3-Zellen, Zeitabhängigkeit mit Celecoxib

Standardabweichungen	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8
0, 1µmolar	8,9%	12,11%	1,85%	9,90%
1 µmolar	15,93%	12,84%	4,97%	6,85%
10 µmolar	7,83%	7,98%	16,67%	17,84%
50 µmolar	22,06%	10,32%	17,52%	13,74%

Am stärksten wachstumshemmend wirkt die höchste Konzentration (50µM Celecoxib, violett) mit einer maximalen Hemmung des Zellwachstums nach sechs Tagen (absolut), relativ liegt die stärkste Hemmung nach zwei Tagen vor (von 100% auf 55%).

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und behandelten Zellen zeigen sich an Tag zwei, vier, sechs und acht bei Inkubation mit Celecoxib 50µM mit einem p-Wert von $p < 0,001$.

Zusammenfassung:

Bezüglich der Wirkung von Celecoxib und Flavopiridol in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer sind die Effekte nicht einheitlich.

Für die weiteren Proliferationsexperimente wurde eine Inkubationszeit von vier Tagen gewählt, da hier für beide Substanzen bei beiden Zelllinien deutliche Effekte nachweisbar waren.

3.3) Konzentrationsversuche

3.3.1) Austestung der Konzentrationen von Flavopiridol

Der Versuchsaufbau ist im Methodenteil unter 2.2.3 sowie in Abbildung 7 beschrieben.

Lineare Betrachtung für BG-1-Zellen

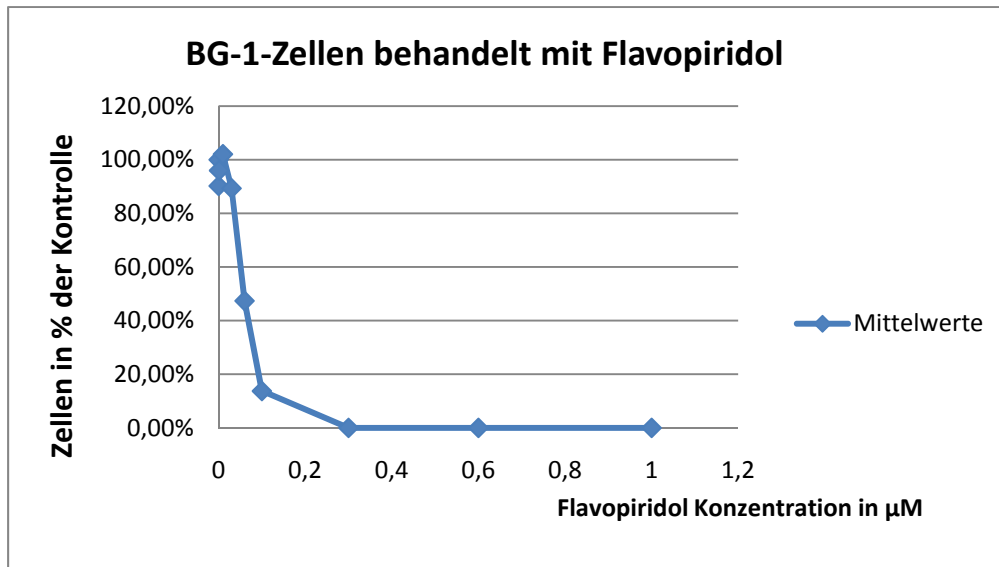


Abbildung 24: BG-1-Zellen, Konzentrationsversuch mit Flavopiridol

X-Achse: Konzentration an Flavopiridol. Y-Achse: Wachstumsrate der BG-1-Zellen.

Mit Hilfe von Microsoft Excel wurden die Werte, für die sich eine annähernd lineare Funktion ergibt ($X \leq 0,3 \mu\text{M}$), durch eine Trendlinie verbunden. Die Gleichung für diese lineare Funktion lautet:

$Y (\text{in}\%) = -844,76x + 101,22$. Die Funktion gilt nur für X-Werte $\leq 0,1198$. Dies entspräche dem Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse.

Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (unter Verwendung des T-Tests für verbundene Stichproben mit einem Vertrauensintervall von 95%) traten ab einer Behandlung mit 30nM Flavopiridol auf ($p = 0,02$), in den noch höheren Konzentrationen war der p-Wert immer $p < 0,001$.

Tabelle 7: Standardabweichungen, BG-1-Zellen, Konzentrationsversuch mit Flavopiridol

0,1nM	1nM	10nM	30nM	60nM	0,1µM	0,3µM	0,6µM	1µM
1,57%	3,04%	15,01%	7,79%	19,49%	19,44%	0%	0%	0%

Eine deutliche Abnahme der Extinktion sieht man ab Inkubation mit $0,06 \mu\text{M}$ Flavopiridol.

Ab einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ wird jegliches Zellwachstum unterdrückt.

Bei der Konzentration von $0,1198 \mu\text{M}$ Flavopiridol findet nach mathematischer Schätzung kein Zellwachstum mehr statt, wenn man eine Antiproportionalität zwischen Zellwachstum und Konzentration des Medikamentes postuliert.

Mit Hilfe der oben aufgeführten Funktion ($Y (\text{in}\%) = -844,76x + 101,22$) lassen sich der IC 30 und der IC 50 errechnen. Der IC 30 bezeichnet die Konzentration, bei der die Zellwachstumsrate nur noch 70% der Wachstumsrate der Kontrolle beträgt, der IC 50 diejenige Konzentration, bei der die Wachstumsrate nur noch 50% der Kontrolle beträgt.

IC 30: 0,0370µMol

$$70\% = -844,76\%x + 101,22\% \rightarrow x = (70\% - 101,22\%) / (-844,76\%)$$

IC 50: 0,0606µMol

$$50\% = -844,76\%x + 101,22\% \rightarrow x = (50\% - 101,22\%) / (-844,76\%)$$

Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle (wieder unter Verwendung des T-Tests für verbundene Stichproben mit einem Vertrauensintervall von 95%), traten ab einer Behandlung mit 30nM Flavopiridol auf ($p = 0,02$), in den noch höheren Konzentrationen war der p-Wert immer $< 0,001$.

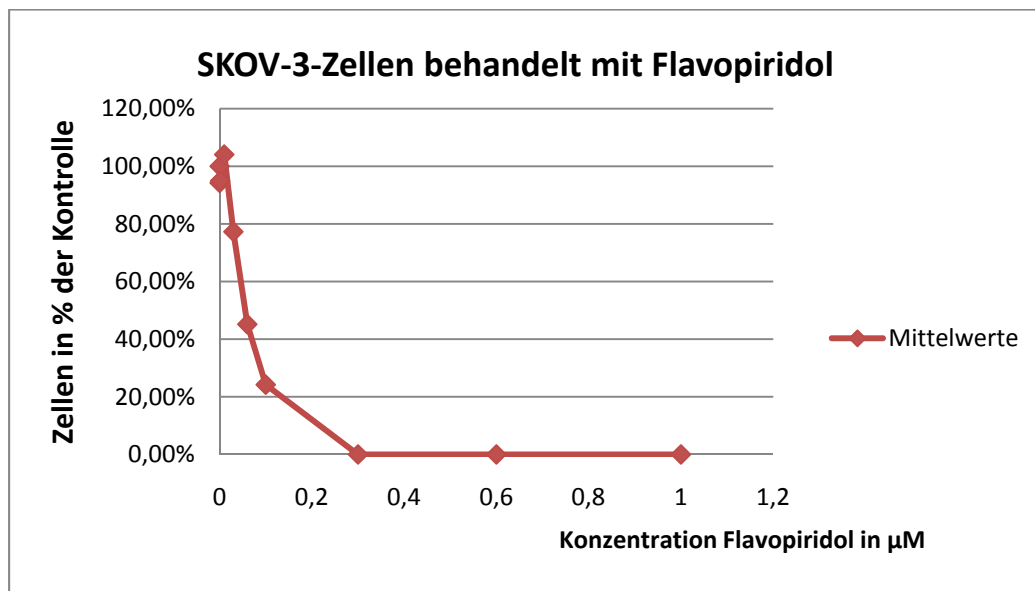
Lineare Betrachtung für SKOV-3-Zellen

Abbildung 25: SKOV-3-Zellen, Konzentrationsversuch mit Flavopiridol

X-Achse: Konzentration an Flavopiridol. Y-Achse: Wachstumsrate der SKOV-3-Zellen.

Mit Hilfe von Microsoft Excel wurden die Werte, für die sich eine annähernd lineare Funktion ergibt ($X \leq 0,3\mu\text{M}$), durch eine Trendlinie verbunden. Die Gleichung für diese lineare Funktion lautet: ($y = -7,8349 x + 0,9964$). Die Funktion gilt nur für X-Werte $\leq 0,1272\mu\text{M}$. Dies entspräche dem Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse.

Ein statistisch signifikanter Unterschied für eine vorliegende Wachstumshemmung gegenüber der Kontrolle ergab sich ab Inkubation mit Flavopiridol 60nM ($p = 0,000\dots$).

Die Standardabweichungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Standardabweichungen, SKOV-3-Zellen, Konzentrationsversuch mit Flavopiridol

0,1nM	1nM	10nM	30nM	60nM	0,1µM	0,3µM	0,6µM	1µM
4,11%	5,07%	4,29%	19,13%	31,96%	17,44%	0%	0%	0%

Die Wachstumsrate der SKOV-3-Zellen nimmt ab einer Konzentration von 30nM

Flavopiridol kontinuierlich ab. In den niedrigeren Konzentrationen lässt sich kein eindeutiger

Effekt auf das Zellwachstum feststellen. Ab Konzentrationen $\geq 0,3\mu\text{M}$ Flavopiridol gibt es kein Zellwachstum mehr.

Mit Hilfe der Trendlinie (Funktion: $(y = -7,8349 x + 0,9964)$; gültig für $x \leq 0,1272\mu\text{M}$, voraussichtlicher Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse) wurden auch hier der IC 30- und IC 50-Wert bestimmt:

IC 30: X = 0,0378 μM

IC50 : X = 0,0634 μM

Ein statistisch signifikanter Unterschied für eine vorliegende Wachstumshemmung gegenüber der Kontrolle ergab sich ab Inkubation mit Flavopiridol 60nM ($p < 0,001$).

3.3.2) Austestung der Konzentrationen von Celecoxib

Versuchsanleitung s. Methoden unter 2.2.3, Abbildung 8.

Lineare Betrachtung für BG-1-Zellen

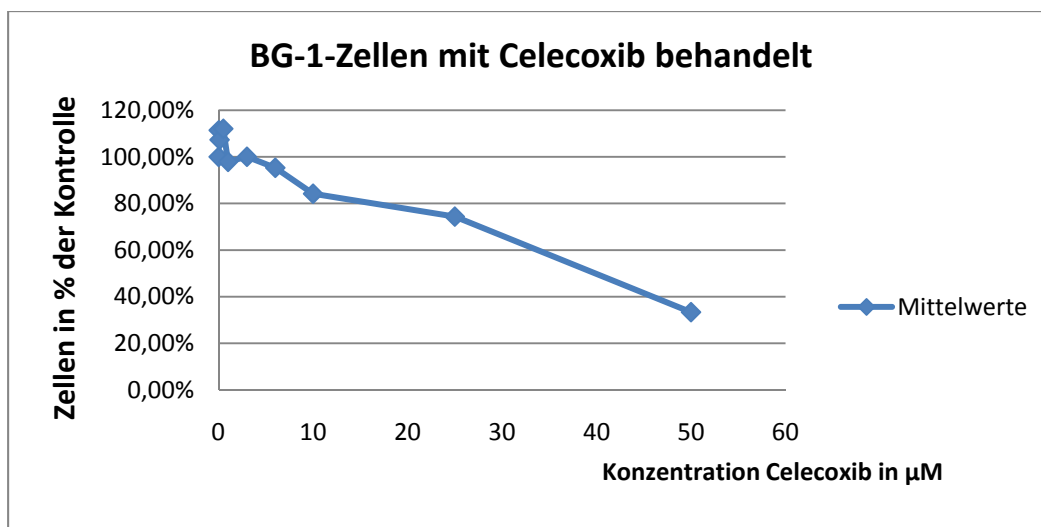


Abbildung 26: BG-1-Zellen, Konzentrationsversuch mit Celecoxib

X-Achse: Konzentration an Celecoxib. Y-Achse: Wachstumsrate der BG-1-Zellen.

Mit Hilfe von Microsoft Excel wurden die Werte, für die sich eine annähernd lineare Funktion ergibt, durch eine Trendlinie verbunden. Die Gleichung für diese lineare Funktion lautet:

$y = (-1,42x + 105,8)$. Statistisch signifikant wird der Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen ab einer Inkubation mit Celecoxib $10\mu\text{M}$ mit einem p-Wert von $p = 0,023$.

Tabelle 9: Standardabweichungen, BG-1-Zellen, Konzentrationsversuch mit Celecoxib

10nM	01, μM	0,5 μM	1 μM	3 μM	6 μM	10 μM	25 μM	50 μM
4,99%	14,72%	12,37%	12,02%	12,82%	15,67%	4,72%	6,92%	9,93%

Man sieht, dass Celecoxib erst ab einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ das Zellwachstum der BG-1-Zellen hemmt. Die Maximalkonzentration von $50\mu\text{M}$ erzielt keine komplette Unterdrückung der Zellproliferation. In den niedrigeren Konzentrationen lässt sich kein eindeutiger Effekt auf das Zellwachstum feststellen.

Insgesamt fällt die Hemmung sehr viel schwächer aus als bei Behandlung mit Flavopiridol.

Das Anlegen einer Trendlinie ergab folgende Funktion: $y = -1,42x + 105,8$.

Die Berechnung des IC 30 und IC 50 ergibt folgende Werte:

IC 30: 24,775µM

IC 50: 38,860µM

Statistisch signifikant wird der Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen ab einer Inkubation mit Celecoxib 10µM mit einem p-Wert von $p = 0,023$, für Celecoxib 25µM beträgt $p = 0,001$ und für Celecoxib 50µM geht p gegen Null.

Lineare Betrachtung für SKOV-3-Zellen

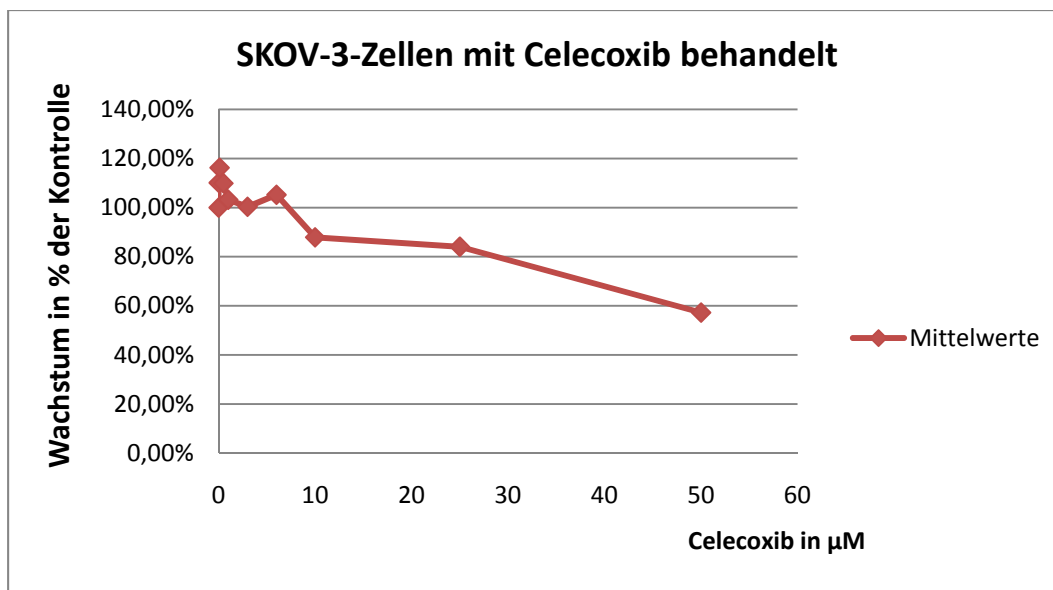


Abbildung 27: SKOV-3-Zellen, Konzentrationsversuch mit Celecoxib

X-Achse: Konzentration an Celecoxib. Y-Achse: Wachstumsrate der SKOV-3-Zellen.

Mit Hilfe von Microsoft Excel wurden die Werte, für die sich eine annähernd lineare Funktion ergibt, durch eine Trendlinie verbunden. Die Gleichung für diese lineare Funktion lautet:

$$Y = -1,01x + 107,02$$

Statistisch signifikant ist der Unterschied zwischen Kontrolle und behandelten Zellen nur bei Inkubation mit 50µM Celecoxib mit $p < 0,001$.

Tabelle 10: Standardabweichungen, SKOV-3-Zellen, Konzentrationsversuch mit Celecoxib

10nM	0,1µM	0,5µM	1µM	3µM	6µM	10µM	25µM	50µM
15,08%	10,90%	5,78%	16,37%	4,78%	12,81%	18,90%	6,92%	6,81%

Celecoxib hemmt erst ab einer Konzentration von 10 bzw. 25 µM das Zellwachstum der SKOV-3-Zellen.

Die Maximalkonzentration erzielt keine Unterdrückung des Zellwachstums um 50%. Der IC 50 konnte mit dieser Versuchsanordnung nicht bestimmt werden.

Dies spiegelt sich auch in der Trendlinie wieder, die im Vergleich zu den anderen Konstellationen sehr flach verläuft.

Außerdem zeigt sich eine proliferationsfördernde Wirkung von Celecoxib auf SKOV-3-Zellen, wenn die Zellen mit niedrigen Konzentrationen behandelt werden.

Eine an die Graphik angelegte Trendlinie wird durch folgende Funktion beschrieben:

$$Y = -1,01x + 107,02.$$

Die Berechnung des IC 50 und IC 30 führt zu folgenden Werten:

$$\mathbf{IC\ 30 = 36,653\ \mu M}$$

$$\mathbf{IC\ 50 = 56,455\ \mu M}$$

Statistisch signifikant ist der Unterschied zwischen Kontrolle und behandelten Zellen nur bei Inkubation mit 50 μ M Celecoxib mit $p < 0,001$.

3.4) Synergismus – Versuche

In diesen Versuchen wurden Celecoxib und Flavopiridol in unterschiedlichen Konzentrationen miteinander kombiniert. Der Versuchsaufbau wird im Methoden-Teil unter 2.2.4.1 erörtert.

3.4.1) für BG-1-Zellen

a) Flavopiridol in drei verschiedenen Basiskonzentrationen, Mittelwerte aus 3 Versuchen

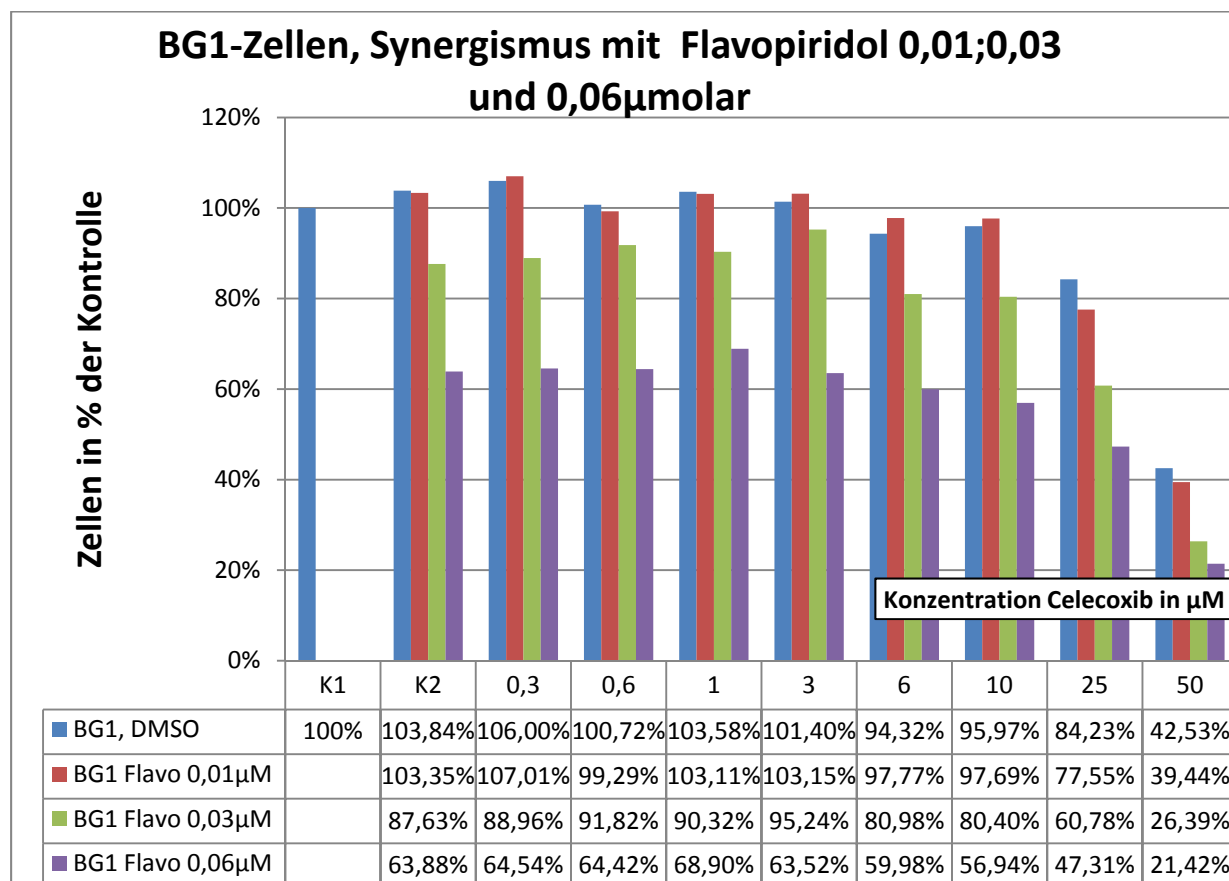


Abbildung 28: BG-1-Zellen, Synergismus-Versuch

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse des Synergismus-Versuchs in Form eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Farben der Balken entsprechen jeweils den verwendeten Grundkonzentrationen an Flavopiridol. Auf der x-Achse sind die beiden Kontrollen und dann - von links nach rechts - die aufsteigenden Celecoxib-Konzentrationen aufgetragen. Der K1-Wert entspricht der Nullkontrolle eines jeden Graphen und wurde =100% gesetzt. Die Zellen wurden dort nur mit 0,5% DMSO versetzt. K2 bezeichnet Zellen, die nur mit den Grundkonzentrationen (0µM; 0,01µM; 0,03µM; 0,06µM) an Flavopiridol behandelt wurden, und stellt somit den Effekt von Flavopiridol allein dar. Die Wirkung von Celecoxib allein spiegelt sich in den blauen Balken wider.

Tabelle 11: Standardabweichungen in %, BG-1-Zellen, Synergismus-Versuch

Flavopiridol in µM	Konzentration von Celecoxib in µM									
	0	0	0,3	0,6	1	3	6	10	25	50
0		6,7	3,3	10,7	4,8	2,5	3,5	5,2	2,8	10,7
0,01		5,7	4,6	6,5	6,8	4,9	8,3	12,9	3,7	4,4
0,03		3,9	9,5	9,4	4,6	6,3	11	6,1	3,9	4,4
0,06		11,1	13,5	12,3	11	13,1	15,8	14,0	19,3	13,3

Die blauen Balken, die der Celecoxib-Wirkung ohne Flavopiridol entsprechen, zeigen eine Hemmung des Zellwachstums ab 25µM Celecoxib.

Eine synergistische Wirkung scheint am ehesten im Bereich hoher Celecoxib-Konzentrationen gepaart mit hohen Flavopiridol-Konzentrationen vorzuliegen, da hier der Effekt der Kombination stärker ist, als der Effekt nur eines Medikamentes.

b) mit Celecoxib in 3 verschiedenen Basiskonzentration

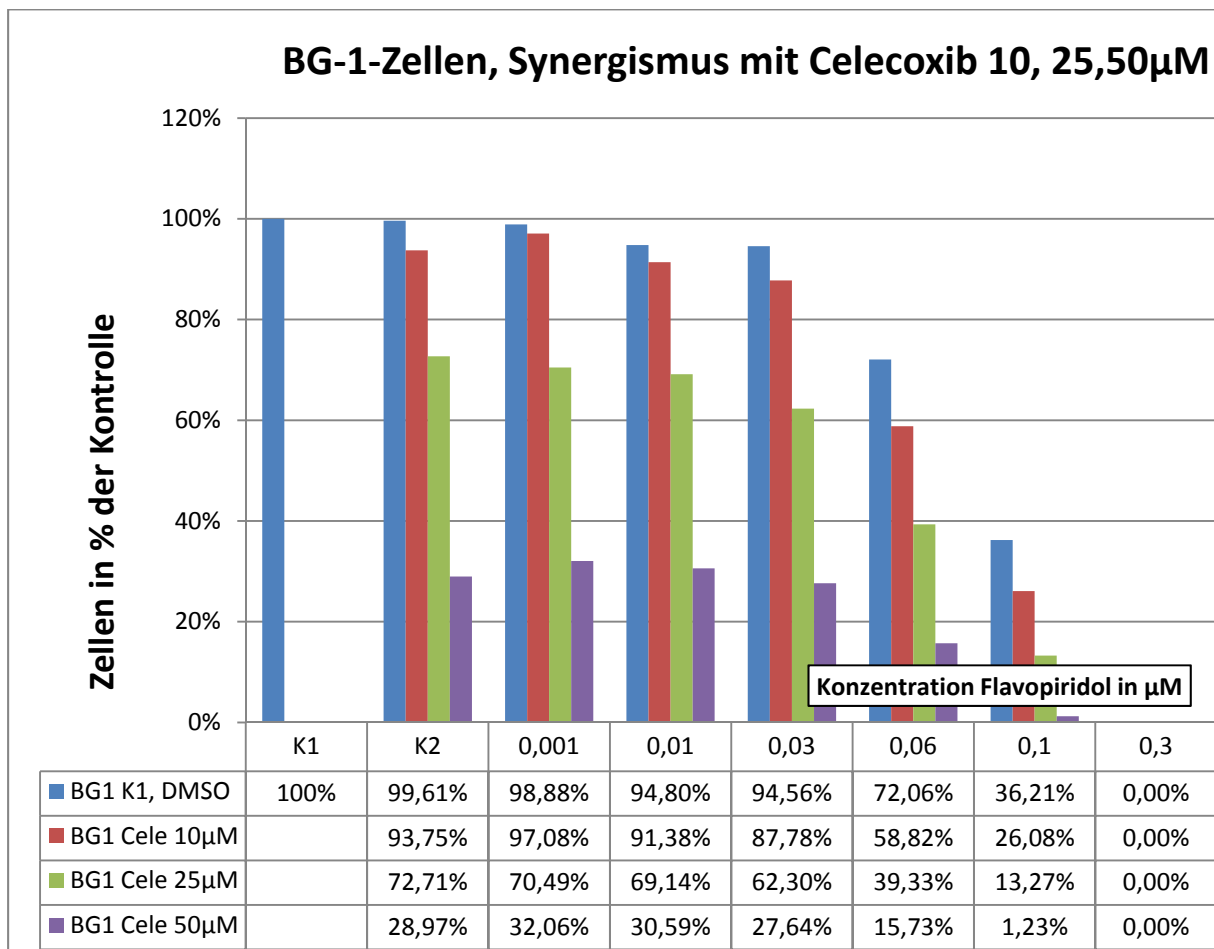


Abbildung 29: BG-1-Zellen, Synergismus-Versuch

Darstellung mittels Balkendiagramm. Drei Grundkonzentrationen an Celecoxib (0µM = blaue Balken, 10µM = rote Balken, 25µM = grüne Balken, 50µM = violette Balken).

X-Achse von links nach rechts: K1: Nullkontrolle, Zellen nur behandelt mit 0,5% DMSO. K2: Wirkung von Celecoxib allein (10µM, 25µM, 50µM). Dann aufsteigende Konzentrationen von Flavopiridol (0,001µM bis 0,3µM). Wirkung von Flavopiridol allein: blaue Balken.

Tabelle 12: Standardabweichungen in %, BG-1-Zellen, Synergismus-Versuch

Celecoxib in µM	Konzentration Flavopiridol in µM							
	0	0	0,001	0,01	0,03	0,06	0,1	0,3
0		1,4%	4,5%	8,7%	8,1%	4,8%	9,8%	0%
10		7,4%	7,4%	5,1%	7,9%	5,8%	8,6%	0,1%
25		2,7%	8,4%	3,5%	8,3%	4,7%	4,4%	0%
50		4,0%	4,5%	5,3%	4,9%	2,0%	1,6%	0,7%

Flavopiridol allein wirkt auf BG-1-Zellen deutlich wachstumshemmend ab einer Behandlung mit 0,06µM Flavopiridol (blaue Balken). Für die ebenfalls getesteten Konzentrationen 0,6µM und 1µM Flavopiridol zeigte sich wie bei 0,3µM kein Zellwachstum mehr, so dass diese Werte nicht im Schaubild dargestellt werden.

Die Kombination aus Celecoxib 25µM oder Celecoxib 50µM mit den höheren Flavopiridol Konzentrationen (ab 0,06µM) unterdrückt das Zellwachstums stärker als die jeweiligen Einzelsubstanzen.

c) Untersuchung auf Synergismus nach Tallarida für BG-1-Zellen

Um eine Aussage bezüglich der Art des Zusammenwirkens von Flavopiridol und Celecoxib auf BG-1-Zellen machen zu können, wurden die experimentell ermittelten Daten mit Hilfe des Synergismus-Modell von Tallarida ausgewertet (s. auch Einleitung).

Hierzu werden die Interaktionsindices berechnet, die eine Aussage darüber ermöglichen, ob die Kombination von Celecoxib und Flavopiridol in den definierten Konzentrationsbereichen additiv (Interaktionsindex =1), subadditiv (Interaktionsindex >1) oder synergistisch (Interaktionsindex <1) wirken.

Den entsprechenden Graphen, die die Wirkung nur einer Substanz beschreiben, wurden Trendlinien angelegt, für die näherungsweise eine lineare Funktion gilt (s. Konzentrationsversuche). Damit ist die Grundvoraussetzung für die Anwendung des Interaktionsindices gegeben: Das Verhältnis der relativen Wirksamkeit der beiden Substanzen ist konstant in den beiden Versuchsanordnungen, da die Dosis-Effekt-Kurve jeweils durch eine Geradengleichung beschrieben wird.

Tabelle 13: Mathematische Untersuchung auf Synergismus nach Tallarida für BG-1-Zellen

Die für die Kombinationspärchen bestimmten Werte der Zelldichte (in % der Kontrolle), wurden als y-Werte in die entsprechenden Funktionen (1. Funktion für Celecoxib als Monosubstanz; 2. Funktion für Flavopiridol als Monosubstanz; oder umgekehrt) eingesetzt und dann nach x aufgelöst. Die x-Werte entsprechen (A) und (B) nach der Gleichung, die Konzentrationen der beiden Kombinationspartner entsprechen (a) und (b).

Cele = Celecoxib; Flavo = Flavopiridol. Fett gedruckt sind die Werte < 1, für die nach der Tallarida-Formel ein hyperadditiver Effekt vorliegt. Nach statistischer Prüfung (T-Test) zeigte sich ein hyperadditiver Effekt nur für die Kombination von 0,03µM Flavopiridol + 50µM Celecoxib ($p < 0,001$).

1) Synergismus mit BG-1-Zellen für Flavo 0,01µM; 0,03µM und 0,06µM

			Flavo als Monosubstanz kalkuliert (A)	Cele als Monosubstanz kalkuliert (B)	Interaktions-index nach Tallarida
		Wachstums- hemmung in	$y = -701,1x + 107,2$	$y = -1,1437x + 104,27$ $x = (y - 104,27) / -1,1437$	
		% der Kontrolle	$x = (y - 107,2) / -701,1$		$\gamma = (a / A) + (b / B)$
Flavo (a)	Cele (b)				
0,01	0,3	107,01	0,00027	ungültig	ungültig
0,01	0,6	99,29	0,01128	4,35429	1,0244
0,01	1	103,11	0,00583	1,01425	2,7003
0,01	3	103,15	0,00578	0,97928	4,79459
0,01	6	97,77	0,01345	5,68331	1,79920
0,01	0	97,69	0,01356	5,75326	2,47537
0,01	25	77,55	0,04229	23,36277	1,30654
0,01	50	39,44	0,09665	56,68445	0,98554
0,03	0,3	88,96	0,02602	13,38638	1,17554
0,03	0,6	91,82	0,02194	10,88572	1,42267
0,03	1	90,32	0,02408	12,19725	1,32802
0,03	3	95,24	0,01706	7,89543	2,13858
0,03	6	80,98	0,03740	20,36373	1,09682
0,03	10	80,4	0,03823	20,87086	1,26395
0,03	25	60,78	0,06621	38,02571	1,11055
0,03	50	26,39	0,11526	68,09478	0,99455
0,06	0,3	64,54	0,06085	34,73813	0,99471
0,06	0,6	64,42	0,06102	34,84305	1,00053
0,06	1	68,9	0,05463	30,92594	1,13066
0,06	3	63,52	0,06230	35,62997	1,04725
0,06	6	59,98	0,06735	38,72519	1,04579
0,06	0	56,94	0,07169	41,38323	1,07861
0,06	25	47,31	0,08542	49,80327	1,20436
0,06	50	21,42	0,12235	72,44033	1,18062

Für die hyperadditiv-wirkenden Kombinationen wurde mittels des T-Tests für verbundene Stichproben mit einem Konfidenz-Intervall von 0,95 die statistische Signifikanz geprüft. Die Abkürzung C steht für Celecoxib, F für Flavopiridol.

Tabelle 14: Signifikanzprüfung

(a+b)= Kombination	Einzelsubstanz A oder B	p-Wert	Signifikant?
0,01µM F + 50µM C	0,01µM F	0,616	NEIN
	50µM C	< 0,001	
0,03µM F + 50µM C	0,03µM F	< 0,001	JA
	50µM C	< 0,001	
0,06µM F + 0,3µM C	0,06µM F	0,879	NEIN
	0,3µM C	< 0,001	

Tabelle 15: Mathematische Untersuchung auf Synergismus nach Tallarida für BG-1-Zellen

Erläuterung s. Tabelle 13. Fett gedruckt sind die Werte < 1, für die nach der Tallarida-Formel ein hyperadditiver Effekt vorliegt. Nach statistischer Prüfung (T-Test) zeigte sich ein hyperadditiver Effekt für alle fettgedruckten Kombinationen.

2) Synergismus mit BG-1-Zellen für Celecoxib 10µM, 25µM, 50µM

			Cele als Monosubstanz kalkuliert (A)	Flavo als Monosubstanz kalkuliert (B)	Interaktionsindex nach Tallarida
		Wachstums- hemmung in % der Kontrolle	$y = -1,4619x + 104,92$ $x = (y - 104,92) / -1,4619$	$y = -344,46x + 95,528$ $x = (y - 95,528) / -344,46$	$\gamma = (a / A) + (b / B)$
Cele (a)	Flavo (b)				
10	0,001	97,08	5,36288	-0,00451	1,64272
10	0,01	91,38	9,26192	0,01204	1,19011
10	0,03	87,78	11,72447	0,02249	2,18665
10	0,06	58,82	31,53430	01,0657	0,88014
10	0,1	26,08	53,92982	0,20161	0,68142
10	0,3	0	71,76961	0,27733	1,22109
25	0,001	70,49	23,55154	0,07269	1,07526
25	0,01	69,14	24,47500	0,07661	1,15199
25	0,03	62,3	29,15384	0,09646	1,16852
25	0,06	39,33	44,86627	0,16315	0,92498
25	0,1	13,27	62,69239	0,23880	0,81753
25	0,3	0	71,76961	0,27733	1.43009
50	0,001	32,06	49,83925	0,18425	1,00865
50	0,01	30,59	50,84479	0,18852	1,03643
50	0,03	27,64	52,86271	0,19709	1,09806
50	0,06	15,73	61,00964	0,23166	1,07854
50	0,1	1,23	70,92824	0,27376	1,07023
50	0,3	0	71,76961	0,27733	1,77843

Alle hyperadditiven Pärchen sind auch nach Durchführung des T-Tests für verbundene Stichproben statistisch signifikant, mit einem maximalen p-Wert von 0,005. Erläuterung der Formeln s. Tabelle 13.

Für die hyperadditiv-wirkenden Kombinationen wurde mittels des T-Tests für verbundene Stichproben mit einem Konfidenz-Intervall von 0,95 die statistische Signifikanz geprüft. Die Abkürzung C steht für Celecoxib, F für Flavopiridol.

Tabelle 16: Signifikanzprüfung

(a+b)= Kombination	Einzelsubstanz A oder B	p-Wert	Signifikant?
10µM C + 0,06µM F	10µM C	0,003	JA
	0,06µM F	< 0,001	
10µM C + 0,1µM F	10µM C	< 0,001	JA
	0,1µM F	0,005	
25µM C + 0,06µM F	25µM C	< 0,001	JA
	0,06µM F	< 0,001	
25µM C + 0,1µM F	25µM C	< 0,001	JA
	0,1µM F	< 0,001	

Mit Hilfe des Tallarida-Indexes stellt sich heraus, dass die Substanzen Flavopiridol und Celecoxib in großen Konzentrationsbereichen subadditiv wirken, also ihre gegenseitige Einzelwirkung eher abschwächen. Zu statistisch signifikanten synergistischen Effekten kommt es nur bei Verwendung höherer Celecoxib-Konzentrationen (Celecoxib $\geq 10\mu\text{M}$) und relativ hoher Flavopiridol-Konzentrationen (Flavopiridol $\geq 0,03\mu\text{M}$).

Legt man die Grenzen für additives Zusammenwirken aufgrund mathematischer Ungenauigkeiten etwas großzügiger fest mit einem Tallarida-Index ~ 1 , findet man eine additive Wirkung der beiden Substanzen für zahlreiche Kombinationen, herausragend ist hier v.a. die Reihe für Cele 50µM + Flavo 0,001µM bis Flavo 0,1µM.

3.4.2) für SKOV-3-Zellen

a) mit Flavopiridol in 3 verschiedenen Basiskonzentrationen

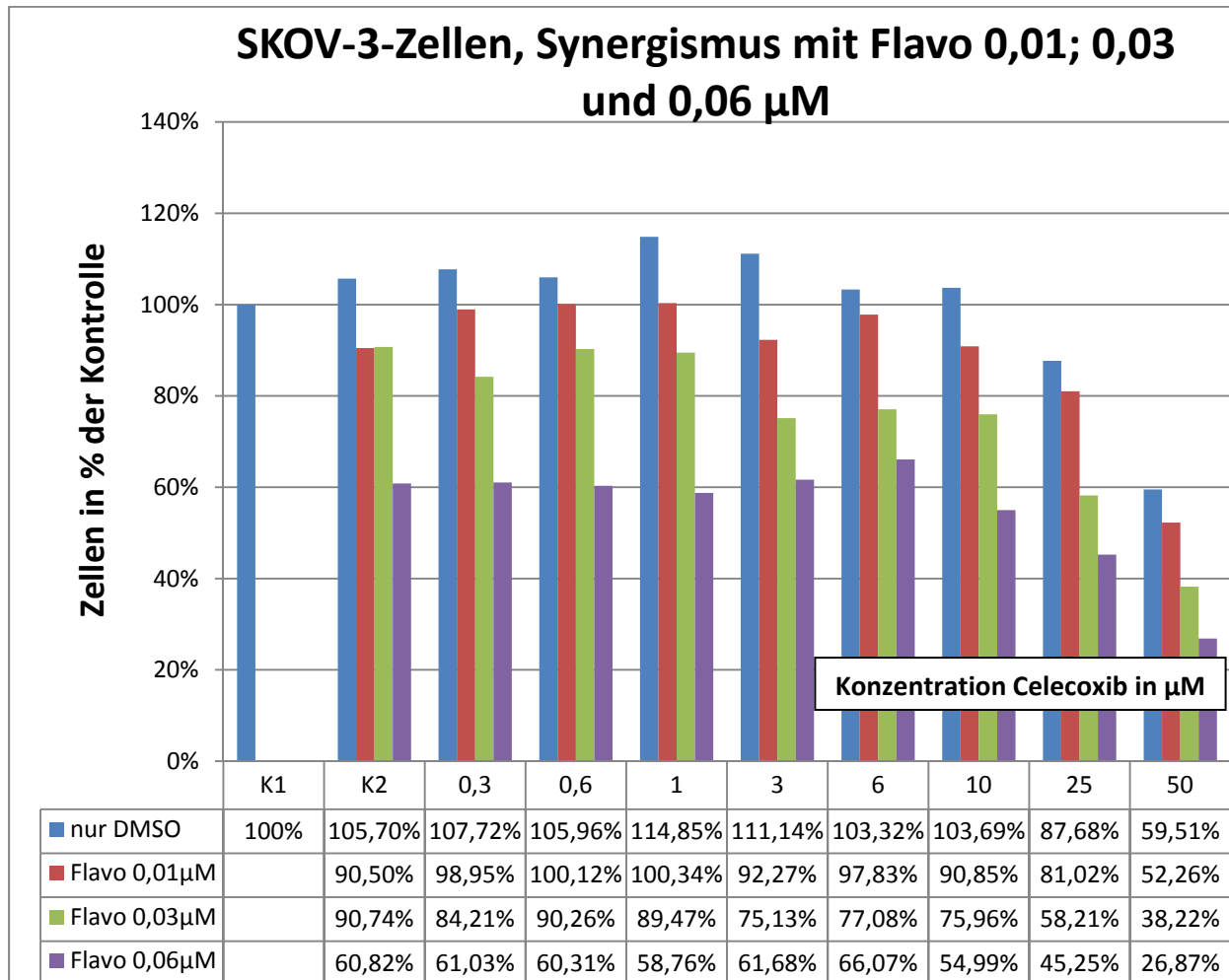


Abbildung 30: SKOV-3-Zellen, Synergismus-Versuch

Legende: s. Abb. 28

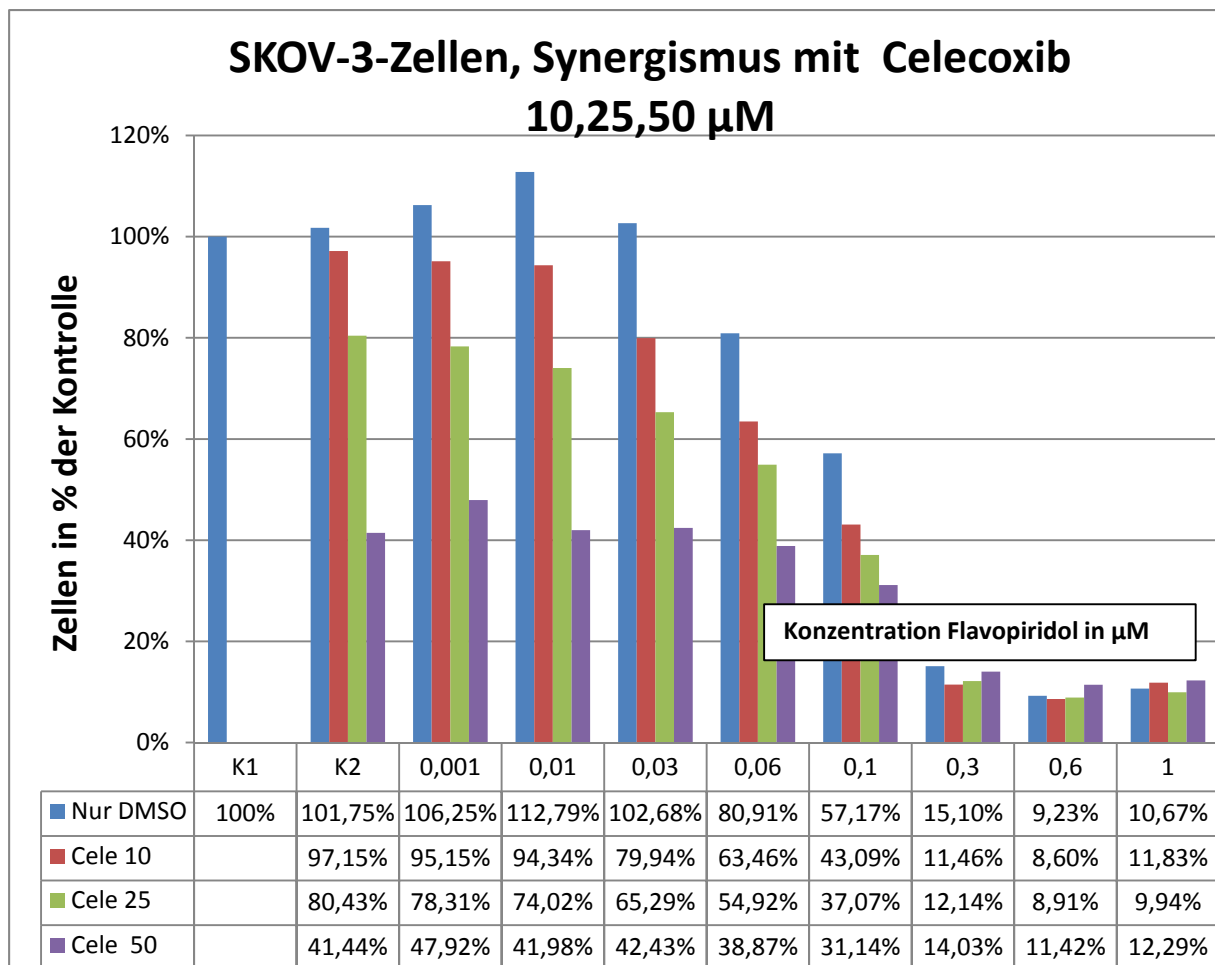
Tabelle 17: Standardabweichungen in %, SKOV-3-Zellen, Synergismus-Versuch

Flavopiridol in μM	Konzentration Celecoxib in μM									
	0	0	0,3	0,6	1	3	6	10	25	50
0		8,1	6,3	8,9	8,2	6%	3,5	11,4	9,3	9,8
0,01		2,3	3,3	1,7	0,0	5,1	3,6	6,0	6,1	13,7
0,03		6,0	3,1	11,5	0,7	4,2	2,9	6,1	4,6	3,0
0,06		5,8	7,3	5,7	6,7	10,5	0,9	9,0	7,9	9,7

Die blauen Balken, die der Wirkung von Celecoxib allein entsprechen, zeigen eine Wachstumshemmung bei Dosierungen von $\geq 25\mu\text{M}$ Celecoxib.

Die Werte von K2 entsprechen der Wachstumshemmung, die Flavopiridol in den 3 Grundkonzentrationen ohne Zugabe von Celecoxib erreicht.

Ab Inkubation mit Celecoxib $\geq 10\mu\text{M}$ sind die Effekte der Kombinationen stärker als die von Flavopiridol allein.

b) mit Celecoxib in 3 verschiedenen Basiskonzentration

Abbildung 31: SKOV-3-Zellen, Synergismus-Versuch

Legende: s. Abb. 29

Tabelle 18: Standardabweichungen in %, SKOV-3-Zellen, Synergismus-Versuch

Celecoxib in μM	Konzentration Flavopiridol in μM									
	0	0	0,001	0,01	0,03	0,06	0,1	0,3	0,6	1
0		3,4	4,2	4,4	6,8	4,0	12,6	3,2	3,1	2,2
10		6,8	7,2	4,3	13,6	10	5,6	4,1	2,0	1,8
25		8,6	7,4	6,5	10,7	12,1	6,6	1,7	1,7	2,6
50		8,7	5,7	7,5	11,2	4,9	4,5	3,3	3,9	2,3

Ab einer Inkubation mit $0,06\mu\text{M}$ Flavopiridol fällt die Wachstumsrate der SKOV-3-Zellen bis zur Maximalkonzentration von $0,6\mu\text{M}$ Flavopiridol deutlich ab, wie man am blauen Balken sehen kann. Für die hohen Flavopiridol-Konzentrationen ($0,3\mu\text{M}$ und $0,6\mu\text{M}$) gilt, dass der wachstumshemmende Effekt nahezu gleich ist, egal ob und in welcher Höhe mit Celecoxib kombiniert wird. Celecoxib hemmt das Wachstum der SKOV-3-Zellen ab Behandlung mit einer Konzentration von $\geq 25\mu\text{M}$ (s.K2). Für die Kombinationspärchen zeigt sich ab Flavopiridol $\geq 0,06\mu\text{M}$ eine deutlich stärkere Wirkung als bei monotherapeutischem Vorgehen.

c) Untersuchung auf Synergismus nach Tallarida für SKOV-3-Zellen

Tabelle 19: Mathematische Untersuchung auf Synergismus nach Tallarida für SKOV-3-Zellen

S. auch Tabelle 13. Die für die Kombinationspärchen bestimmten Werte der Zelldichte (in % der Kontrolle), wurden als y-Werte in die entsprechenden Funktionen (1. Funktion für Flavopiridol als Monosubstanz; 2. Funktion für Celecoxib als Monosubstanz) eingesetzt und dann nach x aufgelöst. Die x-Werte entsprechen (A) und (B) nach der Gleichung, die Konzentrationen der beiden Kombinationspartner entsprechen (a) und (b). Cele = Celecoxib; Flavo = Flavopiridol. Fett gedruckt sind die Werte < 1, für die nach der Tallarida-Formel ein hyperadditiver Effekt vorliegt.

Ein statistisch signifikanter Synergismus liegt bei folgenden Pärchen vor: 0,03µM Flavopiridol + 3µM Celecoxib; 0,03µM Flavopiridol + 6µM Celecoxib; 0,03µM Flavopiridol + 25µM Celecoxib; 0,03µM Flavopiridol + 50µM Celecoxib.

1) Synergismus für SKOV-3-Zellen mit Flavo 0,01µM; 0,03µM und 0,06µM:

			Flavo als Monosubstanz kalkuliert (A)	Cele als Monosubstanz kalkuliert (B)	Interaktionsindex nach Tallarida
		Wachstumshemmung in % der Kontrolle	$y = -607,19x + 100,69$ $x = (y - 100,69) / -607,19$	$y = -0,9585x + 109,53$ $x = (y - 109,53) / -0,9585$	$\gamma = (a / A) + (b / B)$
Flavo (a)	Cele (b)				
0,01	0,3	98,95	0,00287	11,03808	3,51678
0,01	0,6	100,12	0,00094	9,81742	10,7136
0,01	11	100,34	0,00058	9,58790	17,4526
0,01	3	92,27	0,01387	18,00730	0,88773
0,01	6	97,83	0,00471	12,20657	2,61458
0,01	0	90,85	0,01621	19,48878	1,13018
0,01	25	81,02	0,03240	29,74439	1,14918
0,01	50	52,26	0,07976	59,74961	0,96220
0,03	0,3	84,21	0,02714	26,41628	1,11668
0,03	0,6	90,26	0,01718	20,10433	1,77632
0,03	1	89,47	0,01848	20,92853	1,67128
0,03	3	75,13	0,04210	35,88941	0,79625
0,03	6	77,08	0,03888	33,85498	0,94875
0,03	0	75,96	0,04073	35,02347	1,02211
0,03	25	58,21	0,06996	53,54199	0,89573
0,03	50	38,22	0,10288	74,39750	0,96366
0,06	0,6	60,31	0,06650	51,35107	0,91390
0,06	1	58,76	0,06906	52,96818	0,88774
0,06	3	61,68	0,06425	49,92175	0,99399
0,06	6	66,07	0,05702	45,34168	1,18465
0,06	0	54,99	0,07526	56,90141	0,97293
0,06	25	45,25	0,09131	67,06312	1,02992
0,06	50	26,87	0,12158	86,23891	1,07330

Für die hyperadditiv-wirkenden Kombinationen wurde mittels des T-Tests für verbundene Stichproben mit einem Konfidenz-Intervall von 0,95 die statistische Signifikanz geprüft.

Tabelle 20: Signifikanzprüfung:

(a+b) = Kombination	Einzelsubstanz A oder B	p-Wert	Signifikant?
0,01µM F + 3µM C	0,01µM F	0,704	NEIN
	3µM C	0,006	
0,01µM F + 50µM C	0,01µM F	< 0,001	NEIN
	50µM C	0,189	
0,03µM F + 3µM C	0,03µM F	0,018	JA
	3µM C	< 0,001	
0,03µM F + 6µM C	0,03µM F	< 0,001	JA
	6µM C	0,001	
0,03µM F + 25µM C	0,03µM F	< 0,001	JA
	25µM C	< 0,001	
0,03µM F + 50µM C	0,03µM F	< 0,001	JA
	50µM C	< 0,001	
0,06µM F + 0,6µM C	0,06µM F	0,817	NEIN
	0,6µM C	< 0,001	
0,06µM F + 1µM C	0,06µM F	< 0,001	NEIN
	1µM C	0,606	
0,06µM F + 3µM C	0,06µM F	0,801	NEIN
	3µM C	< 0,001	
0,06µM F + 10µM C	0,06µM F	0,279	NEIN
	10µM C	< 0,001	

Tabelle 21: Mathematische Untersuchung auf Synergismus nach Tallarida für SKOV-3-Zellen

S. auch Tabelle 13 und 19. Fett gedruckt sind die Werte < 1 , für die nach der Tallarida-Formel ein hyperadditiver Effekt vorliegt.

Ein statistisch signifikanter Synergismus liegt bei folgenden Pärchen vor: Celecoxib 25 μ M + 0,1 μ M Flavopiridol; Celecoxib 50 μ M + 0,001 μ M Flavopiridol; Celecoxib 50 μ M + 0,1 μ M Flavopiridol.

2) Synergismus für SKOV-3-Zellen mit Celecoxib 10 μ M, 25 μ M und 50 μ M

			Cele als Monosubstanz kalkuliert (A)	Flavo als Monosubstanz kalkuliert (B)	Interaktionsindex nach Tallarida
			$y=-0,955x +106,25$ $x=(y-106,25) / -0,955$	$y =-164,35x + 96,779$ $x= (y-96,779) / (-164,35)$	$\gamma = (a / A) + (b / B)$
Wachstumshemmung in % der Kontrolle					
Cele (a)	Flavo (b)				
10	0,001	89,64	17,39267	0,04344	0,59798
10	0,01	100,4	6,11518	ungültig	ungültig
10	0,03	84,61	22,65969	0,07404	0,84648
10	0,06	73,84	33,93717	0,13957	0,72454
10	0,1	50,42	58,46073	0,28207	0,52557
10	0,3	17	93,45550	0,48542	0,72502
10	0,6	11,33	99,39267	0,51992	1,25463
25	0,001	88,15	18,95288	0,05250	1,33811
25	0,01	83,07	24,27225	0,08341	1,14987
25	0,03	80,14	27,34031	0,10124	1,21072
25	0,06	71,86	36,01047	0,15162	1,08996
25	0,1	46,27	62,80628	0,30733	0,72344
25	0,3	13,7	96,91099	0,50550	0,85144
25	0,6	10,06	100,7225	0,52765	1,38533
50	0,001	55,95	52,67016	0,24843	0,95333
50	0,01	52,63	56,14660	0,26863	0,92775
50	0,03	57,41	51,14136	0,23954	1,10292
50	0,06	44,45	64,71204	0,31840	0,96110
50	0,1	33,75	75,91623	0,38350	0,91937
50	0,3	18,4	91,98953	0,47690	1,17260
50	0,6	16,62	93,85340	0,48773	1,76293

Für die hyperadditiv-wirkenden Kombinationen wurde mittels des T-Tests für verbundene Stichproben mit einem Konfidenz-Intervall von 0,95 die statistische Signifikanz geprüft, s. Tabelle 22.

Tabelle 22: Signifikanzprüfung

(a+b) = Kombination	Einzelsubstanz A oder B	p-Wert	Signifikant?
10µM C + 0,001µM F	10µM C	0,749	NEIN
	0,001µM F	0,776	
10µM C + 0,03µM F	10µM C	0,088	NEIN
	0,03µM F	0,001	
10µM C + 0,06µM F	10µM C	< 0,001	NEIN
	0,06µM F	0,061	
10µM C + 0,1µM F	10µM C	< 0,001	NEIN
	0,1µM F	0,209	
10µM C + 0,3µM F	10µM C	< 0,001	NEIN
	0,3µM F	0,616	
25µM C + 0,1µM F	25µM C	< 0,001	JA
	0,1µM F	0,006	
25µM C + 0,3µM F	25µM C	< 0,001	NEIN
	0,3µM F	0,861	
50µM C + 0,001µM F	50µM C	0,036	JA
	0,001µM F	< 0,001	
50µM C + 0,01µM F	50µM C	0,890	NEIN
	0,01µM F	< 0,001	
50µM C + 0,06µM F	50µM C	0,263	NEIN
	0,06µM F	< 0,001	
50µM C + 0,1µM F	50µM C	0,001	JA
	0,1µM F	< 0,001	

Nur für die Pärchen mit geringer Konzentration an Celecoxib und geringer Konzentration an Flavopiridol findet man ausschließlich subadditive Wirkungen.

Statistisch signifikante synergistische Wirkungen gibt es bei einer mittleren Konzentration an Flavopiridol von 0,03µM in Kombination mit höheren Celecoxib-Konzentrationen (3µM, 6µM und 25µM) sowie für die höchste Konzentration an Flavopiridol (0,1µM) in Kombination mit ebenfalls hohen Celecoxib-Konzentrationen (25 und 50µM).

Fazit:

Für beide Zelllinien scheint zu gelten, dass die Kombination der beiden Medikamente im niedrigen Dosis-Bereich vor allem zu subadditiven Wirkungen führt. Bei Kombination der Medikamente in höheren Dosierungen treten zunehmend synergistische Effekte auf, dies gilt v.a. für Celecoxib. Bei Verwendung der höchsten Dosis an Flavopiridol kommt es zumindest bei den BG-1-Zellen schon allein durch die Wirkung des Flavopiridol zu einem fast kompletten Untergang des Zellwachstums, so dass die Zugabe von Celecoxib keinen additiven Effekt mehr erzeugen kann.

3.5) Zellzyklusanalyse

Für BG-1-Zellen

Die FACS-Methode erlaubt die Zuordnung einzelner Zellen einer untersuchten Probe zu den verschiedenen Zellphasen.

Versuchsaufbau: s.o. unter 2.2.5, Tabelle 1.

Die in drei Versuchsdurchführungen gewonnen Ergebnisse werden hier anhand eines Balkendiagrammes dargestellt.

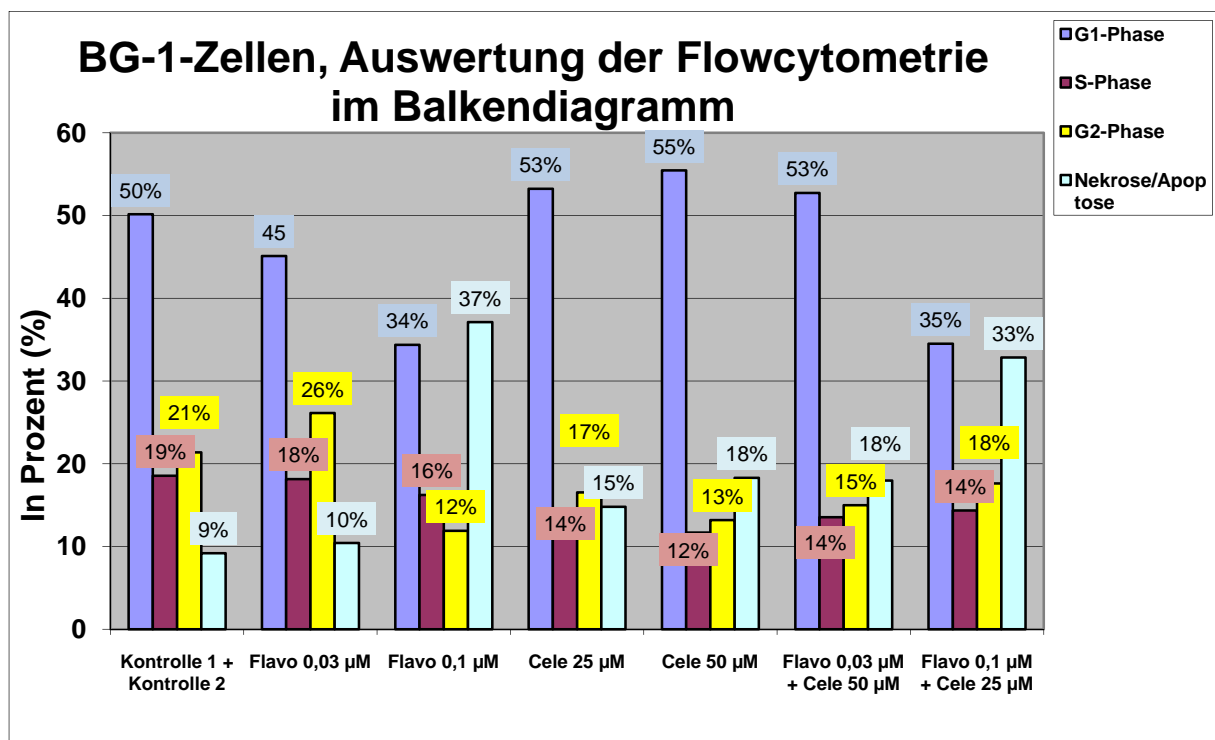


Abbildung 32: BG-1-Zellen, Zellzyklusanalyse

Die applizierten Konzentrationen sind jeweils unter den aus vier Balken bestehenden Gruppen, die einer Probe entsprechen, angegeben. Die Prozentzahlen wurden auf- bzw. abgerundet, so dass manchmal die Summe der Prozentwerte eines Versuches nicht genau 100% ergibt. Eine Versuchskonstellation wird immer mit vier Balken abgebildet, wobei der erste Balken (blau) dem Anteil an Zellen in der G₁-Phase, der zweite Balken (violett) dem Anteil an der S-Phase, der dritte Balken (gelb) dem Anteil an der G₂/M-Phase und der letzte Balken (mintfarben) dem nekrotisch-apoptotischen Anteil entspricht.

Die Standardabweichungen für die oben dargestellten Versuche liegen bei $\leq 7\%$.

Bei unbehandelten BG-1-Zellen befinden sich etwa 50% in der G₁-Phase, die S- und G₂/M-Phase sind mit 19% bzw. 21% vertreten (Proliferationsindex = 40%), der Zellschrott beläuft sich auf 9%.

Durch alleinige Behandlung mit Celecoxib nimmt der Anteil an Zellen in der G₁-Phase leicht zu. Der Proliferationsindex (S+G₂-Phase) nimmt ab.

Der Anteil an Zelltrümmern nimmt mit steigender Celecoxib-Konzentration ebenfalls zu.

Wird Flavopiridol als Monosubstanz verwendet, kommt es zu einer Abnahme des Anteils an Zellen in der G₁-Phase.

Die Zunahme der apoptotisch-nekrotischen Fraktion bei Behandlung mit 0,1 µM Flavopiridol fällt deutlich aus (von 9% auf 37%).

Die Kombination von Flavopiridol 0,03 µM mit Celecoxib 50 µM führt zu einer Verdopplung des Zellschrotts (auf 18%) bei gleichzeitiger Abnahme des Proliferationsindex.

In der umgekehrten Paarung (Flavopiridol 0,1 µM + Celecoxib 25 µM) kommt es zu einer Abnahme der G₁-Phase von 50% auf 35% sowie zu einem Zuwachs der apoptotisch-nekrotischen Fraktion von 9% auf 33%.

Die Standardabweichungen für die FACS-Versuche mit BG-1-Zellen liegen bei $\leq 7\%$.

Für SKOV-3-Zellen

Die Ergebnisse aus drei Versuchen werden hier mit Hilfe eines Balkendiagrammes veranschaulicht.

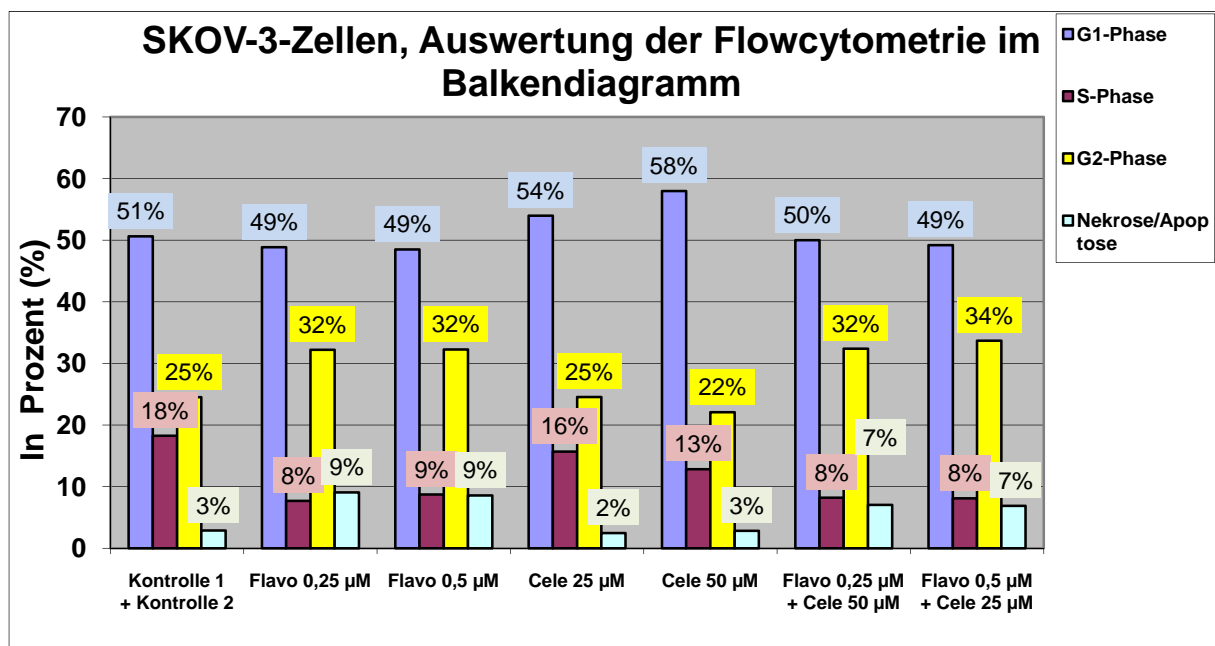


Abbildung 33: SKOV-3-Zellen, Zellzyklusanalyse

s. Abb. 32

Beachten Sie, dass die Konzentrationen an Flavopiridol nicht die gleichen sind wie für die BG-1-Zellen. Hier wird mit 0,25 µM und 0,5 µM Flavopiridol gearbeitet.

Die Standardabweichungen für die hier dargestellten Versuche liegen bei $\leq 8,2\%$.

Wie bei den BG-1-Zellen befindet sich die Hälfte unbehandelter SKOV-3-Zellen in der G₁-Phase, 18% befinden sich in der S-Phase und 25% in der G₂/M-Phase (d.h. Proliferationsindex bei 43%). Der Anteil an Zellschrott ist gegenüber den BG-1-Zellen (9%) mit 3% geringer.

Die Behandlung mit 0,25µM und 0,5µM Flavopiridol führt annähernd zum gleichen Ergebnis: Der Anteil an Zellen in der G₁-Phase ändert sich nur geringfügig.

Der Anteil an nekrotischen Zellen verdreifacht sich, der an Zellen in der S-Phase halbiert sich. Der Proliferationsindex bleibt annähernd gleich.

Werden die SKOV-3-Zellen mit Celecoxib als Einzelsubstanz inkubiert, nimmt der G₁-Anteil leicht zu (bei Inkubation mit 25µM Celecoxib um 3% auf 54%, bei der doppelten Dosis um 7% auf 58%).

Bei Verwendung von 50µM Celecoxib als Einzelsubstanz nimmt der Anteil an Zellen in der S-Phase von 18% auf 13% ab, der der G₂/M-Phase fällt von 25% auf 22%.

Die apoptotisch-nekrotische Fraktion bleibt im Vergleich zur Kontrolle konstant.

Bei der Betrachtung der Kombination von Flavopiridol und Celecoxib wiederholen sich annähernd die Effekte der Behandlung wie bei Behandlung mit Flavopiridol als Monosubstanz.

Die Standardabweichungen für die FACS-Versuche mit SKOV-3-Zellen liegen bei $\leq 8,2\%$.

Qualität der Auswertung:

Ein wichtiges Merkmal zur Beurteilung der Qualität der vorgenommenen Auswertung mittels der Flowcyometrie ist der sogenannte CV-Wert. Dieser Wert sollte für die G₁-Phase (M im Histogramm) 8% nicht übersteigen. In allen durchgeführten Experimenten liegt dieser Wert bei $\leq 7,5\%$.

Fazit:

Insgesamt beeinflussen Flavopiridol und Celecoxib als Einzelsubstanzen sowie in Kombination den Zellzyklus von SKOV-3-Zellen weniger als den von BG-1-Zellen.

3.6) Annexin-Versuch

Der Annexin-Versuch ermöglicht es, die in den FACS-Versuchen mit „apoptotisch-nekrotischer Fraktion“ oder „Zellschrott“ relativ vage definierte Phase, genauer zu untersuchen.

Für BG-1-Zellen

Die Ergebnisse aus den drei Versuchsdurchführungen werden mit einem Balkendiagramm zusammengefasst.

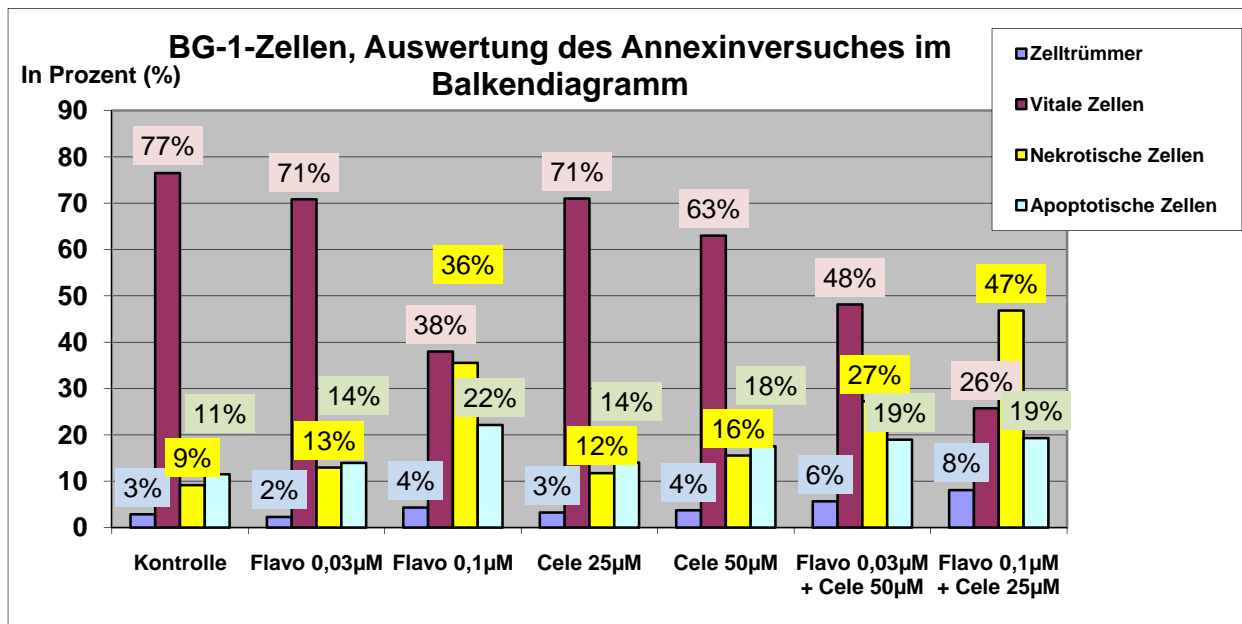


Abbildung 34: BG-1-Zellen, Annexin-Versuch

Von links nach rechts sind hier die Ergebnisse für die Kontrolle und für die verschiedenen Medikamenten-Konzentrationen dargestellt. Auch hier sind die Daten für eine Versuchsanordnung in Form von 4 Balken dargestellt, die bei Addition ~100% ergeben.

Der erste Balken (blau) entspricht dem Anteil an Zellen des entsprechenden Versuchs im linken oberen Quadranten (s. Abb. 18, S.44). Sie werden als Zelltrümmer bezeichnet. Der zweite Balken (violett) entspricht dem linken unteren Quadranten, dem Anteil an vitalen Zellen. Der dritte Balken (gelb) entspricht dem rechten oberen Quadranten, das heißt, den nekrotischen Zellen. Der letzte Balken (mintfarben) zeigt den Anteil an apoptotischen Zellen an.

Der Versuchsaufbau verwendet identische Medikamenten-Konzentrationen wie die FACS- Versuche für BG-1-Zellen.

Die Standardabweichungen für die hier dargestellten Versuche sind $\leq 6,2\%$.

Bei den unbehandelten BG-1-Zellen werden 77% der Zellen als vital erkannt, bereits 3% der Zellen stellen nur noch Zelltrümmer dar, 9% der Zellen sind bereits nekrotisch und 11% der Zellen apoptotisch.

Bei Behandlung mit Flavopiridol 0,03µM nimmt der Anteil an vitalen Zellen leicht ab, die Apoptose-Fraktion steigt von 11% auf 14%, die nekrotische Fraktion von 9% auf 13%.

Bei Behandlung mit der höheren Dosis Flavopiridol (0,1µM) halbiert sich der Anteil an vitalen Zellen von 77% auf 38%. Der Anteil der apoptotischen Zellen verdoppelt sich von 11% auf 22%. Die Rate an nekrotischen Zellen vervierfacht sich von 9% auf 36%.

Die Wirkung von Celecoxib als Einzelsubstanz in der Konzentration von 25µM führt praktisch zu den gleichen Verteilungsveränderungen der BG-1-Zellen auf die verschiedenen Quadranten wie die niedrigere Flavopiridol-Konzentration.

Bei Behandlung mit 50µM Celecoxib sinkt der Anteil an vitalen Zellen von 77% auf 63% ab. Die Zahl an nekrotischen und apoptotischen Zellen nimmt zu, und zwar von 9% auf 16% (Nekrose) und von 11% auf 18% (Apoptose).

Beim ersten Kombinationsversuch (Flavopiridol 0,03µM + Cele 50µM), fällt der Anteil an vitalen Zellen deutlich von 77% auf 48%. Der Anteil nekrotischer Zellen verdreifacht sich gegenüber der Kontrolle auf 27%. Die Apoptose-Fraktion nimmt von 11% auf 19% zu. Der Anteil an Zelltrümmern verdoppelt sich von 3% auf 6% gegenüber der Kontrolle.

Bei der Kombination von Flavopiridol 0,1µM + Cele 25µM sinkt der Anteil an vitalen Zellen sogar auf 26% (Kontrolle 77%). Der Anteil an nekrotischen Zellen ist mit 47% mehr als 5mal höher als in der Kontrolle (9%). Die Apoptoserate steigt von 11% auf 19%. Der Anteil an Zelltrümmern nimmt um fünf Prozentpunkte auf 8% zu.

Fazit:

Sowohl Celecoxib als auch Flavopiridol induzieren in BG-1-Zellen Apoptose und Zellnekrose, wobei dieser Effekt bei Flavopiridol deutlicher ausgeprägt ist (Verdopplung von 11% auf 22% in der hohen Konzentrationsstufe).

Die Kombination der beiden Medikamente führt nicht zu einer Steigerung der Apoptoserate.

Die Kombination beider Medikamente führt jedoch zu einem deutlichen Rückgang des Anteils an vitalen Zellen, v.a. durch eine Steigerung der Zellnekrose.

Die Standardabweichungen für die Annexin-Versuche mit BG-1-Zellen liegen bei $\leq 6,2\%$.

Für SKOV-3-Zellen

Zusammenfassende Darstellung der drei Versuchsdurchführungen mit Hilfe eines Balkendiagrammes:

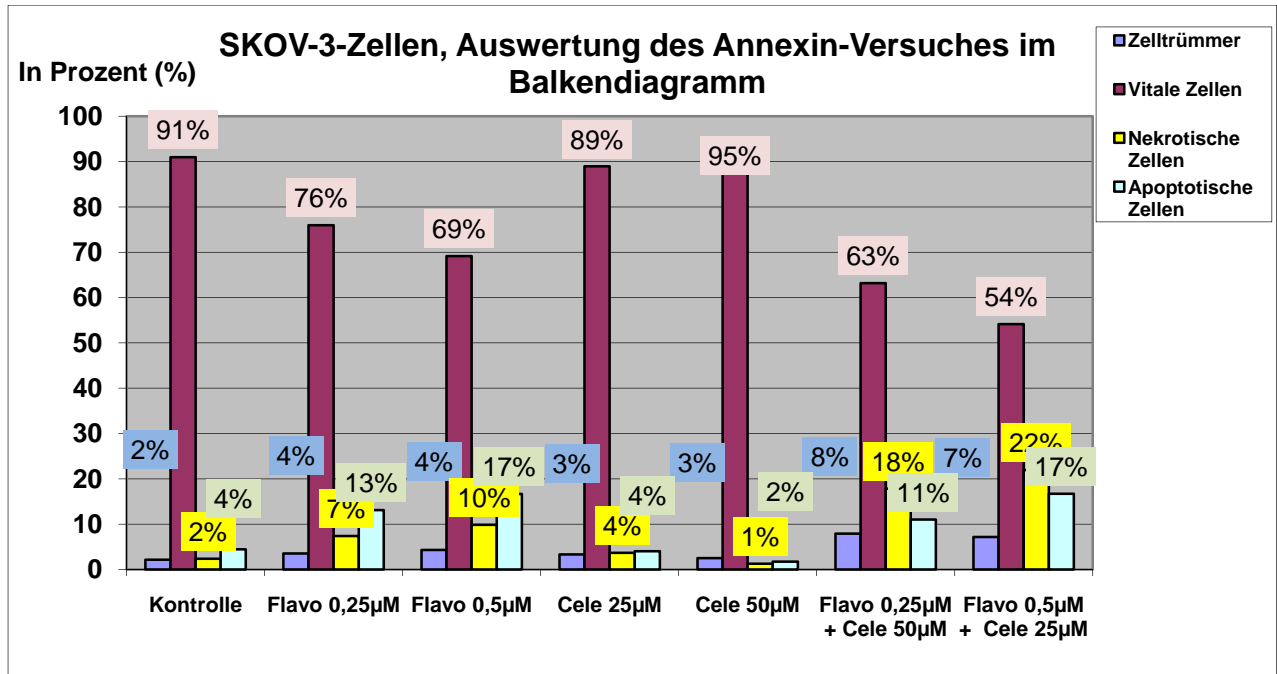


Abbildung 35: SKOV-3-Zellen, Annexin-Versuch

s. Abb. 34. Die verwendeten Konzentrationen entsprechen denen des FACS-Versuches für SKOV-3-Zellen, s. auch Abb. 18 im Methodenteil.

Die Standardabweichungen für die hier dargestellten Versuche liegen bei $\leq 13,7\%$.

Die Kontrolle entspricht den nicht-behandelten SKOV-3-Zellen. Von diesen sind 91% vitale Zellen, 2% sind nekrotisch, 4% apoptotisch und 2% sind nur noch Zelltrümmer.

Bei Behandlung mit Flavopiridol in der Konzentration von 0,25µM reduziert sich der Anteil an vitalen Zellen auf 76%, die Rate nekrotischer Zellen steigt auf 7%, die Rate apoptotischer Zellen nimmt auf 13 Prozentpunkte zu, mehr als eine Verdreifachung gegenüber der Kontrolle. Bei der höheren Flavopiridol-Konzentration (0,5µM) nimmt der Anteil an vitalen Zellen um weitere acht Prozentpunkte ab auf 69% (Kontrolle 91%), der Anteil an nekrotischen Zellen steigt auf 10% (Verfünffachung gegenüber der Kontrolle), der Anteil an apoptotischen Zellen steigt auf 17% (Kontrolle 4%).

Bei alleiniger Behandlung mit Celecoxib 25µM ändert sich nur sehr wenig gegenüber der Kontrolle.

Bei Inkubation mit 50µM Celecoxib nimmt der Anteil an vitalen Zellen von 91% auf 95% zu, der Anteil an nekrotischen und apoptotischen Zellen hingegen halbiert sich jeweils gegenüber der Kontrolle.

Bei der Kombination von Flavopiridol 0,25µM mit Celecoxib 50µM nimmt der Anteil an vitalen Zellen deutlich ab von 91% auf 63%. Der Effekt ist wesentlich stärker als bei Applikation der Einzelsubstanzen. Im Gegenzug steigt vor allem die Rate an nekrotischen Zellen von 2% in der Kontrolle auf 18%. Auch dieser Effekt ist wesentlich stärker ausgeprägt als bei Verwendung der Einzel-Substanzen. Der Anteil an apoptotischen Zellen steigt auf 11% (von 4%), der Anteil an Zelltrümmern vervierfacht sich auf 8%.

Bei der anderen Kombination (Flavopiridol 0,5µM + Celecoxib 25µM) sind diese Effekte noch stärker ausgeprägt. Der Anteil an vitalen Zellen liegt nur noch bei 54% (Kontrolle 91%). Der Anteil an nekrotischen Zellen liegt bei 22% (Kontrolle: 2%; Flavo 0,5µM allein: 10%, Cele 25: 4%). Die Apoptoserate liegt bei 17%, die Zelltrümmerfraktion ist mit 7% erhöht.

Fazit:

Flavopiridol induziert bei SKOV-3-Zellen Apoptose. Des Weiteren steigert es die Nekroserate. Dieser Effekt tritt dosisabhängig auf.

Bei alleiniger Behandlung mit Celecoxib nimmt der Anteil vitaler Zellen zu im Sinne eines paradoxen, Zell-protectiven Effektes. Die Fraktion nekrotischer und apoptotischer Zellen nimmt mit steigender Celecoxib-Konzentration ab.

Bei Betrachtung der Kombination kommt es trotz des vermeintlich protektiven Effekts von Celecoxib auf die SKOV-3-Zellen zu einer Verstärkung der Effekte, die zuvor für Flavopiridol beobachtet wurden. Die Steigerung der Zytotoxizität erfolgt wie bei den BG-1-Zellen in erster Linie über eine Zunahme der Nekrose.

In Analogie zu den FACS-Versuchen ist die Wirkung der Medikamente auf SKOV-3-Zellen schwächer als auf BG-1-Zellen.

Die Standardabweichungen für die FACS-Versuche mit SKOV-3-Zellen liegen bei $\leq 13,7\%$. Dieser hohe Wert wurde nur erreicht bei der letzten Kombination in der Graphik.

3.7) Western Blots

Die Western Blots wurden mit drei Antikörpern jeweils doppelt durchgeführt.

3.7.1) Kontroll-Blot mit Anti- β -Aktin-Antikörper

Dieser Antikörper detektiert das Protein β -Aktin und überprüft die gleichmäßige Ladung der Kammern mit Protein. In den nun folgenden Abbildungen entsprechen die Banden nacheinander von links nach rechts folgenden Medikamenten Konzentrationen:

Tabelle 23:

Inkubationskonzentrationen für die beiden Zelllinien für die Durchführung der Western Blots

Für BG-1-Zellen	Für SKOV-3-Zellen
1) Kontrolle	8) Kontrolle
2) 0,03 μ M Flavopiridol	9) 0,25 μ M Flavopiridol
3) 0,1 μ M Flavopiridol	10) 0,5 μ M Flavopiridol
4) 25 μ M Celecoxib	11) 25 μ M Celecoxib
5) 50 μ M Celecoxib	12) 50 μ M Celecoxib
6) 0,03 μ M Flavopiridol + 50 μ M Celecoxib	13) 0,25 μ M Flavopiridol + 50 μ M Celecoxib
7) 0,1 μ M Flavopiridol + 25 μ M Celecoxib	14) 0,5 μ M Flavopiridol + 25 μ M Celecoxib

Für BG-1-Zellen

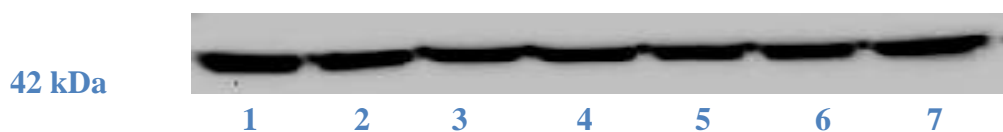


Abbildung 36: BG-1-Zellen, β -Aktin-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von β -Aktin nach Chemolumineszenz-Reaktion und Sichtbarmachung durch die zugehörige Software (s. S. 49).

Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 links aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die BG-1-Zellen behandelt wurden.

Man sieht eine fast gleiche Ladung der Kammern, die Intensität der Banden ist gleich groß.

Teilweise verschwinden die Grenzen zwischen den Lanes.

Die Belichtungszeit betrug 60 Sekunden.

Für SKOV-3-Zellen

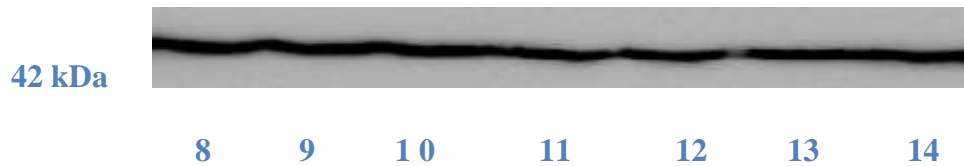


Abbildung 37: SKOV-3-Zellen, β -Aktin-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von β -Aktin nach Chemolumineszenz-Reaktion und Sichtbarmachung durch die zugehörige Software (s. S. 49).

Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 rechts aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die SKOV-3-Zellen behandelt wurden.

Auch hier sieht man eine gleichmäßige Ladung der Kammern, das Signal ist weniger intensiv als bei den BG-1-Zellen. Die Grenzen zwischen den Banden verschwimmen. Die Belichtungszeit betrug 60 Sekunden.

3.7.2) Western Blot mit Anti-pan-RAS-Antikörper

Die verwendeten Konzentrationen entsprechen denen in Tabelle 23.

Für BG-1-Zellen

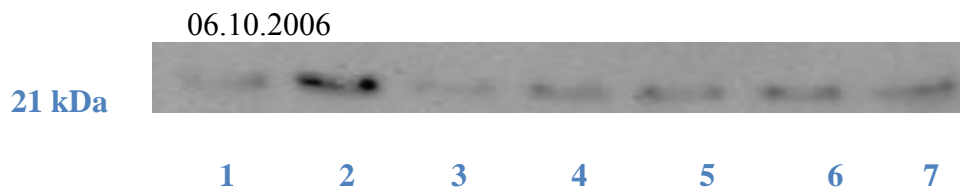


Abbildung 38: BG-1-Zellen, Ras-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von Ras-Protein (Versuch 1).

Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 links aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die BG-1-Zellen behandelt wurden.

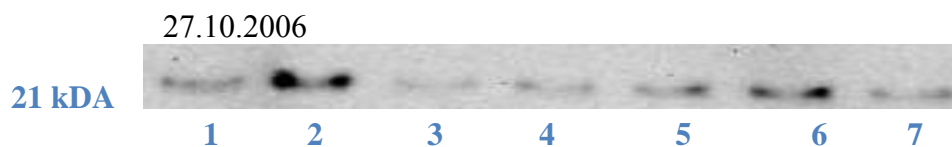


Abbildung 39: BG-1-Zellen, Ras-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von Ras-Protein (Versuch 2).

Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 links aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die BG-1-Zellen behandelt wurden.

In beiden Blots erkennt man die deutlichste Detektion in der zweiten Bande, also bei Inkubation mit 0,03µM Flavopiridol. Des Weiteren kann man auch in den Banden 4-7 eine Verstärkung der Signalintensität beobachten, besonders in der 6. Bande (0,03µM Flavopiridol + 50µM Celecoxib).

Zu diesem Ergebnis kommt auch die Auswertung mit der Software, die die Signalintensität der einzelnen Banden in % der Kontrolle (Mittelwerte aus den 2 Versuchen) angibt:

Tabelle 24: Signalintensität der Banden für BG-1-Zellen

Die die Lanes nummerierenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 links aufgeführten Konzentrationen.

Lane	1	2	3	4	5	6	7
Intensität in % der Kontrolle	100	260	71	83,5	111,5	140,5	118,5

Das könnte bedeuten, dass Flavopiridol in niedriger Konzentration, sowohl allein als auch mit Celecoxib, Proteine der RAS-Gruppe induziert.

Für SKOV-3-Zellen

06.10.2006

21 kDa



8 9 10 11 12 13 14

Abbildung 40: SKOV-3-Zellen, Ras-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von Ras-Protein (Versuch 1).

Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 rechts aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die SKOV-3-Zellen behandelt wurden.

27.10.2006

21 kDa



8 9 10 11 12 13 14

Abbildung 41: SKOV-3-Zellen, Ras-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von Ras-Protein (Versuch 2).

Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 rechts aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die SKOV-3-Zellen behandelt wurden.

Auch hier ist erkennbar, dass die letzten Banden und insbesondere die zwölfte Bande sehr starke Signale aussenden, dass hier also die größte Menge an pan-RAS-Protein-Komplex detektiert wurde, wohingegen in der Kontrolle und den Banden 8 und 9 deutlich weniger Protein nachgewiesen wurde.

Die Analyse mit der Software ergab folgende Ergebnisse in % der Kontrolle (Mittelwerte aus den zwei Versuchen):

Tabelle 25: Signalintensität der Banden für SKOV-3-Zellen

Die die Lanes nummerierenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 rechts aufgeführten Konzentrationen.

Lane	8	9	10	11	12	13	14
Intensität in % der Kontrolle	100	104	86	121	448	261	163

Die Analyse bestätigt den optischen Eindruck: Bei Behandlung der SKOV-3-Zellen mit Celecoxib 50µM allein kommt es zu einer Steigerung der Signalstärke um das 4,5fache (Lane 2). In Lane 3 wird neben der Behandlung mit Flavopiridol 0,25µM ebenfalls mit Celecoxib 50µM behandelt, hier nimmt die Signalstärke immerhin noch um das 2,6fache gegenüber der Kontrolle zu. Während die Behandlung mit Flavopiridol in niedriger Dosierung keine Effekte zeigt und in hoher Dosierung die Signalintensität dämpft, zeigt auch die niedrigere Dosis von Celecoxib pan-RAS-induzierende Wirkung, wie man an Lane 11 sieht und evtl. auch in der letzten Kombination (Lane 14).

Fazit zu pan-RAS:

Die beiden Zelllinien reagieren sehr unterschiedlich bezüglich der Expression der Proteingruppe pan-RAS auf Celecoxib und Flavopiridol. Während bei den BG-1-Zellen die niedrigere Dosis Flavopiridol induzierend zu wirken scheint, wirkt bei den SKOV-3-Zellen die hohe Dosis Celecoxib eindeutig induzierend. Die hohe Dosis Flavopiridol allein senkt bei beiden Zelllinien die Expression an RAS-Proteinen.

3.7.3) Western Blot mit Anti-AKT-Antikörper

Die Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 aufgeführten Konzentrationen.

Für BG-1-Zellen

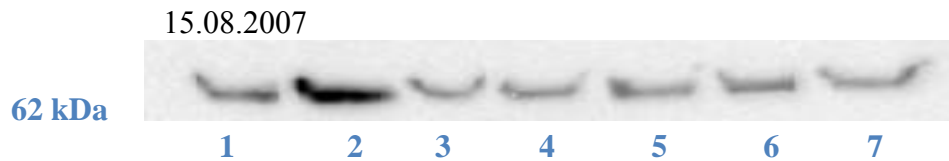


Abbildung 42: BG-1-Zellen, AKT-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von AKT (Versuch 1).

Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 links, S. 81, aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die BG-1-Zellen behandelt wurden.



Abbildung 43: BG-1-Zellen, AKT-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von AKT (Versuch 2).

Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 links, S. 81, aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die BG-1-Zellen behandelt wurden.

Auffällig ist hier die zweite Bande mit der niedrigeren Flavopiridol-Konzentration (0,03µm), die ein deutlich verstärktes Signal aufweist. Ansonsten ist die Kontrolle im Vergleich zu den anderen Lanes intensiver schwarz gefärbt.

Die Software-Analyse kommt zu folgenden Ergebnissen (Mittelwerte):

Tabelle 26: Signalintensität der Banden für BG-1-Zellen.

Die die Lanes nummerierenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23, S.81, links aufgeführten Konzentrationen.

Lane	1	2	3	4	5	6	7
Intensität in % der Kontrolle	100	210	58	53,5	44,5	68,5	50

Bei der Signalverstärkung in Lane 2 handelt es sich um eine Verdopplung des Signals. Die niedrigere Flavopiridol-Konzentration scheint einen AKT-induzierenden Effekt zu haben. Im dritten Lane sieht man eine starke Abnahme der Signalintensität. Das bedeutet, dass Flavopiridol in hoher Dosierung die Expression von AKT unterdrückt. Noch stärker ist dieser Effekt bei Celecoxib ausgeprägt, das in seiner Maximaldosis von 50µM zu einer Abnahme der Signalintensität auf 44,5% der Kontrolle führt, aber auch bei Celecoxib 25µM ist schon eine Unterdrückung der Signalstärke auf 53,5% der Kontrolle zu verzeichnen.

Für SKOV-3-Zellen

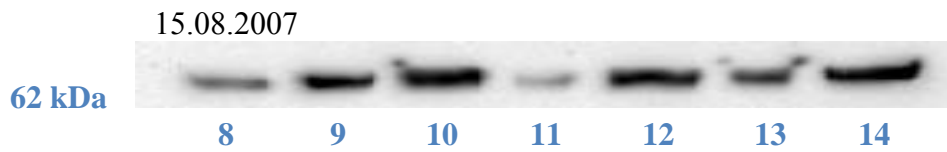


Abbildung 44: SKOV-3-Zellen, AKT-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von AKT (Versuch 1). Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 rechts, S.81, aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die SKOV-3-Zellen behandelt wurden.

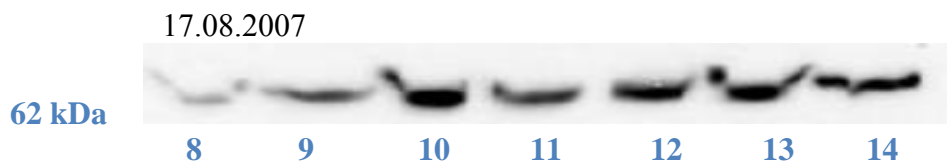


Abbildung 45: SKOV-3-Zellen, AKT-Western-Blot

Darstellung der Proteinbanden beim Nachweis von AKT (Versuch 2). Die unter den Banden stehenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 rechts, S.81, aufgeführten Konzentrationen der Medikamente, mit denen die SKOV-3-Zellen behandelt wurden.

Es fällt auf, dass die Kontrolle ein schwaches Signal aussendet, während Lane 9,10,12,13 und 14 wesentlich stärker detektieren.

Die Auswertung der Software kommt zu folgendem Ergebnis (Mittelwerte aus 2 Experimenten):

Tabelle 27: Signalintensität der Banden für SKOV-3-Zellen.

Die die Lanes nummerierenden Zahlen entsprechen den in Tabelle 23 rechts, S.81, aufgeführten Konzentrationen.

Lane	8	9	10	11	12	13	14
Intensität in % der Kontrolle	100	209	403	198	319	223	240

Die Software-Analyse bestätigt, dass in der Kontrolle das schwächste Signal besteht, während in allen anderen Proben den Protein-Komplex AKT stärker detektiert wird. Dies geschieht proportional zur Dosierung der Einzelsubstanzen, das heißt, mehr Flavopiridol bzw. Celecoxib führt zu einem stärkeren AKT-Signal.

Fazit zu Anti-AKT:

Die beiden Zelllinien reagieren erneut sehr unterschiedlich auf die Medikamente. Während es bei den BG-1-Zellen bis auf eine Ausnahme zu einer deutlichen Senkung der Expression des Proteinkomplexes Akt kommt, findet man bei den SKOV-3-Zellen eine deutliche Induktion nach Medikamentengabe.

4) Diskussion

Das Ovarialkarzinom ist nach wie vor der gynäkologische Tumor mit der schlechtesten Prognose. Dies kann zum Teil dadurch erklärt werden, dass der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnose schon in mehr als 75% der Fälle die Grenzen des kleinen Beckens überschritten hat. Nach Abschluss der Primärbehandlung erleiden mehr als zwei Drittel der Patientinnen ein Rezidiv, das schließlich zum Tode führt.

Dies verdeutlicht einmal mehr, wie wichtig es ist, einerseits die Suche nach Screening-Verfahren voranzutreiben und andererseits neue Therapieansätze zu entwickeln.

Mit letzterem hat sich diese Dissertation auseinandergesetzt.

4.1) Diskussion der Ergebnisse

4.1.1) Färbung der Zellen mit Kristallviolett

Diese ergab eine Proportionalität der Zelldichte zur Intensität des Extinktionssignals. Es handelt sich hierbei um ein etabliertes Verfahren.

4.1.2) Vergleich der Zeitabhängigkeiten bezüglich der Proliferationshemmung

Für BG-1-Zellen

Für die Behandlung der BG-1-Zellen ergab sich ein Wirkungsoptimum von Flavopiridol am zweiten bis vierten Tag, für Celecoxib ebenfalls. Für die folgenden Versuche wurde mit viertägiger Inkubationszeit weitergearbeitet, da es bei Celecoxib auch noch gute Effekte nach sechs Tagen Inkubation gab. Es existiert keine Literatur über die Behandlung von BG-1-Zellen mit Flavopiridol.

Für SKOV-3-Zellen

Favopiridol erzielte die deutlichste Unterdrückung des Zellwachstums nach vier Tagen, Celecoxib nach sechs Tagen. Für Celecoxib zeigten sich aber auch deutliche Effekte nach vier Tagen Inkubationszeit. In Hinblick auf die geplanten Synergismus-Versuche wurde mit einer viertägigen Inkubationszeit weitergearbeitet.

Hierzu gibt es ähnliche Angaben in der Literatur: Victor Vital Reyes et al. behandelten SKOV3-Zellen mit Celecoxib über 24, 48, 72 und 96 Stunden. Sie stellten ein Wirkungsmaximum nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden, also 3 Tagen fest (172).

4.1.3) Vergleich der Proliferationshemmung bzw. der IC₅₀-Werte mit der Literatur

Flavopiridol

Der IC₅₀ für die SKOV-3-Zellen bei Behandlung mit Flavopiridol lag bei den hier durchgeführten Untersuchungen bei 63nM, in der Literatur findet sich ein Beitrag, der von 350nM Flavopiridol spricht, also mehr als dem 5fachen (96). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die unterschiedlich langen Inkubationszeiten sein.

Insgesamt findet man wenige Publikationen, in denen auch das Verhalten von BG-1-Zellen beschrieben wird. Hier liegen bis jetzt keine Daten zum IC₅₀-Wert bei Behandlung mit Flavopiridol vor. Der hier ermittelte IC₅₀ liegt mit 61nM niedrig.

Flavopiridol und andere Ovarialkarzinomzelllinien

Für die Zelllinien OV202 und OV202hp (high passage) untersuchten Bible, K.C. et al. den IC₉₀, der für die OV202-Zellen 220nM und für die OV202hp-Zellen 1100nM betrug (11).

Fazit:

Insgesamt reihen sich die hier ermittelten Daten in die bereits bestehender Publikationen ein. Flavopiridol hemmt die Proliferation von SKOV-3- und BG-1-Zellen sehr effektiv. Für BG-1-Zellen wurde dieser Effekt zum ersten Mal nachgewiesen. Er ist bei den BG-1-Zellen stärker ausgeprägt als bei den SKOV-3-Zellen.

Gegenüber anderen Ovarialkarzinom-Zelllinien-Typen scheinen die hier verwendeten Zelllinien sehr sensibel auf die Behandlung mit Flavopiridol zu reagieren.

Tabelle 28: IC₅₀-Werte von Flavopiridol bei Ovarialkarzinomzelllinien

Autor	Zelllinie	Substanz in nM	Veränderung gegenüber der Kontrolle
Frank Mayer et al. 2005 (96)	SKOV-3	Flavopiridol 350	-50%
Bible, K.C. et al. 2000 (11)	OV 202	Flavopiridol 220	-90%
Bible, K.C. et al. 2000 (11)	OV 202hp	Flavopiridol 1100	-90%
Eigene Daten 2006	SKOV-3	Flavopiridol 63	-50%
	BG-1	Flavopiridol 61	-50%

Celecoxib

Bei Behandlung der SKOV-3-Zellen mit Celecoxib wurde als Maximal-Dosis von vorneherein 50µM festgelegt. Diese Dosis reichte nicht aus, um eine Wachstumshemmung von 50% zu erreichen. Der mathematisch bestimmte IC 50-Wert betrug 56,6µM.

In der Literatur findet man folgende Angaben bezüglich des IC50 von Celecoxib bei SKOV-3-Zellen: Wang, H.J. et al. ermittelten den IC50-Wert für SKOV-3-Zellen bei 24stündiger Applikation bei 50µM Celecoxib (176). Song, Y.C. et al. stellten eine Wachstumshemmung von 40% nach Zugabe von 40µM Celecoxib fest (154).

Vital-Reyes et al. konstatierten eine signifikante Proliferationshemmung für SKOV-3-Zellen und weitere Ovarialkarzinomzelllinien bei Inkubation mit Konzentrationen \geq 70µM Celecoxib (IC50 abgelesen aus Diagramm bei \sim 70µM). Bei Verwendung von 100µM Celecoxib konstatierten sie Panzytotoxizität (172).

Auch hier gibt es keine Publikationen zum Vergleich der IC 50-Werte für die BG-1-Zellen. In diesen Untersuchungen wurde der IC50 durchschnittlich bei einer Konzentration von 38,9µM Celecoxib erreicht. Für die BG-1- sowie die SKOV-3-Zellen fällt außerdem eine Wachstumsförderung bei Behandlung mit Celecoxib-Konzentrationen im Bereich $< 1\mu\text{M}$ auf.

Fazit:

Celecoxib hat deutliche proliferationshemmende Effekte auf beide Zelllinien. Die für SKOV-3-Zellen ermittelten IC50-Werte liegen im Bereich der bis jetzt publizierten Werte.

Die Proliferationshemmung ist bei den BG-1-Zellen stärker. Im Vergleich zu anderen Ovarial-Karzinomzelllinien sind eher hohe Dosierungen zum Erreichen einer 50%igen Proliferationshemmung notwendig, s. Tabelle 29 und 30.

Tabelle 29: Celecoxib, Proliferationshemmung bei SKOV-3-Zellen

Autor	Zelllinie	Substanz in μM	Veränderung gegenüber der Kontrolle
Wang, H.J. et al. 2007 (176)	SKOV-3	Celecoxib 50	-50%
Song, Y.C. et al. 2007 (154)	SKOV-3	Celecoxib 40	-40%
Vital- Reyes et al. 2006 (172)	SKOV-3	Celecoxib 100	-100%
Eigene Daten 2006	SKOV-3	Celecoxib 56,6	-50%
Eigene Daten 2006	BG-1	Celecoxib 39,9	-50%

Tabelle 30: Celecoxib, IC 50-Werte bei anderen Ovarialkarzinomzelllinien (15)

Zelllinie	IC-50-Wert für Celecoxib
A 2780	18,1 μM
H34	36,9 μM
OVCAR-3	12,1 μM
IGROV-1	27,5 μM

Die für Celecoxib erzielten IC-50-Werte fügen sich in die Literatur ein. Dem mathematisch bestimmten IC-50-Wert für die SKOV-3-Zellen liegt eine lineare Gleichung zugrunde, dieser Wert ist mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet.

4.1.4) Interpretation der Proliferationshemmung in den Kombinationsversuchen

Für BG-1-Zellen:

Die gewonnenen Daten zeigen überwiegend eine Wirkungsabschwächung der beiden Medikamente bei gemeinsamer Applikation, v.a. bei Applikation in niedriger Dosierung. Es zeigt sich aber auch, dass es bei Einsatz höherer Dosierungen der beiden Medikamente zu additiven Effekten (Tallarida ~ 1) und teilweise auch zu signifikanten synergistischen Effekten kommt. Es ist schwierig, eindeutige Empfehlungen aus diesen Ergebnissen abzuleiten. Man könnte sie so formulieren: Die Kombination von Celecoxib und Flavopiridol wirkt nur in höheren Dosierungsbereichen additiv oder synergistisch. Es ist sinnvoll mit Flavopiridol $0,6\mu\text{M}$ + Celecoxib bzw. mit Celecoxib $50\mu\text{M}$ + Flavopiridol in vitro zu arbeiten.

Für SKOV-3-Zellen

Die vorliegenden Ergebnisse spiegeln alle drei Möglichkeiten des Zusammenwirkens zweier Substanzen wieder: subadditiv, additiv (Tallarida ~ 1) und synergistisch. Auf SKOV-3-Zellen wirkt die Kombination von Celecoxib und Flavopiridol in weiten Bereichen vermutlich additiv. Für Pärchen im niedrigen Dosierungsbereich (v.a. mit niedriger Konzentration an Flavopiridol) findet man auch subadditive Wirkungen. Statistisch signifikante synergistische Effekte liegen hier bei Kombination von Celecoxib in folgenden Dosierungen vor ($3\mu\text{M}$, $6\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$ und $50\mu\text{M}$) mit Flavopiridol $0,03\mu\text{M}$ und bei Kombination der höchsten Dosis Flavopiridol ($0,1\mu\text{M}$) mit den höchsten Dosierungen von Celecoxib (25 und $50\mu\text{M}$).

Fazit:

Die Kombination von Celecoxib und Flavopiridol zeigt bei Applikation an zwei verschiedenen *in-vitro* Ovarialkarzinomzelllinien in bestimmten Konzentrationsbereichen additive oder sogar synergistische Effekte. Dadurch könnten in der Klinik eventuell unerwünschte Nebenwirkungen vermieden werden oder die für die Einzelsubstanzen in vivo oft schwierig zu erreichenden erforderlichen Plasma-Konzentrationen gesenkt werden.

Diese Ergebnisse stellen jedoch nur einen Anfang dar. In vitro zeigten sich auch subadditive Effekte in vielen Konzentrationsbereichen. In dem Bereich der Krebsforschung, der sich mit dem Zusammenwirken von Medikamenten befasst, vor allem in vivo, steckt sicherlich zukunftsweisendes Potential.

4.1.5) Vergleich der FACS-Analysen

Flavopiridol

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Flavopiridol beeinflusst massiv den Zellzyklus von SKOV-3- und BG-1-Zellen.

Für SKOV-3-Zellen beobachtet man eine Abnahme des S-Phasen-Anteils bei gleichzeitiger Zunahme der G₂-Phase. Der Sub-G₁-Gipfel verdreifacht sich von 3% auf 9%.

Für die BG-1-Zellen kommt es zu einer deutlichen Abnahme der G₁-Fraktion mit einem starken Anstieg der Sub-G₁-Fraktion.

Auswirkungen von Flavopiridol auf BG-1-Zellen im FACS

Im Gegensatz zu den SKOV-3-Zellen nahm der Anteil an Zellen in der G₁-Phase Dosisabhängig ab. Die Zunahme der Sub-G₁-Phase sticht heraus, sie vervierfachte sich gegenüber der Kontrolle mit 9% auf 37% bei Applikation von 0,1 μ M Flavopiridol.

Also führt die Behandlung mit Flavopiridol in BG-1-Zellen zu Zelluntergang.

Auswirkungen von Flavopiridol auf SKOV-3-Zellen im FACS

Die G₁-Phase verändert sich gegenüber der Kontrolle nicht, es befinden sich jeweils 50% der Zellen in dieser Phase. Der Anteil an Zellen in der S-Phase halbiert sich allerdings bei Zugabe von Flavopiridol von 18% auf 9% bzw. 8%. Die G₂/M-Phase nimmt jedoch um 7%-Punkte zu, so dass man hier einen G₂/M-Arrest vermuten kann. Insgesamt heißt das aber auch, dass sich der Proliferationsindex (= S+ G₂/M-Anteil) kaum ändert. Der Anteil am Sub-G₁-Gipfel nimmt zu, er verdreifacht sich von 3 auf 9%.

Dies bedeutet, dass die Applikation von Flavopiridol auch in SKOV-3-Zellen zu Zelltod führt.

Leider gibt es keine Berichte für diese beiden Zelllinien in der Literatur, so dass auf andere Ovarialkarzinomzelllinie zurückgegriffen werden muss:

Song, Y.C. et al. stellten die Induktion von Apoptose für die Ovarialkarzinomzelllinie AO fest (maximale Apoptoserate bei 10,7% bei Behandlung mit Flavopiridol 300nM). Bei gleichzeitiger Steigerung der G₁-Progression und Abnahme der S-Phase (154). In den Untersuchungen von Raju, U. et al. mit der Ovarialkarzinomzelllinie OCA-I führte die Behandlung mit 50-300nM Flavopiridol (24h) Dosisabhängig zu einer Akkumulation der Zellen in der G₁- und G₂-Phase. Gleichzeitig sank der Anteil an der S-Phase erheblich.

Außerdem zeigte sich in einer Färbung, dass die Apoptose-Rate von 1,3% in der Kontrolle auf 22,5% bei Behandlung mit Flavopiridol anstieg (116).

Tabelle 31: Überblick der Beeinflussung des Zellzyklus durch Flavopiridol

Zelllinie	Flavopiridol-Dosis	Zellzyklus	Autor
OV 202 (Ovarial-Ca)	250, 450, 1100nM	G ₂ /M-Verschiebung	Bible, K.C., Boerner et al. (11)
OV 202 hp (Ovarial-Ca)	250, 450, 1100nM	Kein Effekt	
AO (Ovarial-Ca)	300nM	G ₁ -Arrest, S↓	Song et al. (154)
OCA-1 (Ovarial-Ca)	50-300nM	G ₁ - und G ₂ -Arrest	Raju et al. (116)
3 Keimzelltumoren des Ovars (NT2, NCCIT, 2102 EP)	10,50,10 nM	Kein Effekt	Mayer et al. (96)
MDA-MB-468 (Mamma-Ca)	300nM	G ₁ -Arrest	Carlson, B.A. et al. (25)
MCF-7 (Mamma-Ca)	300nM	G ₁ -Arrest	
Glioblastome (7 verschiedene Zelllinien)	Nicht beschrieben	G ₂ -Arrest	Alonso et al. (7)
NSCLC (A549)	100-500nM	G ₁ -Arrest	Shapiro et al. (145)

Man sieht, dass Flavopiridol sowohl G₁- als auch G₂-Arrest erzeugen kann. Der hier beobachtete G₂-Arrest bei den SKOV-3-Zellen passt in dieses Bild.

Bei den BG-1-Zellen findet man weder G₁- noch G₂-Arrest, hier ist die Zunahme des Sub-G₁-Gipfels dominant. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Song und Raju.

Hieraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass Flavopiridol in den beiden Zelllinien SKOV-3 und BG-1 über die Aktivierung bzw. Unterdrückung andersartiger Signalketten zu Wachstumshemmung oder Zelltod führt.

Celecoxib:

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Die BG-1-Zellen reagieren mit einer Zunahme der G₁-Population und einer Verdopplung des Sub-G₁-Gipfels.

Celecoxib beeinflusst den Zellzyklus der SKOV-3-Zellen kaum.

Auswirkungen von Celecoxib auf BG-1-Zellen im FACS

Die BG-1-Zellen reagierten deutlich auf die Behandlung mit Celecoxib. In der Kontrolle befanden sich hier 50% der Zellen in der G₁-Phase, der Anteil des Sub-G₁-Gipfels betrug 9%. Hervorzuheben ist die deutliche Zunahme des Sub-G₁-Anteils, also des Anteils an toten Zellen, der sich verdoppelte von 9% auf 18%, also um 100 relative Prozentpunkte. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Celecoxib bei BG-1-Zellen Zelltod (sei es in Form von Nekrose oder Apoptose) induzieren kann.

Es gibt keine Vergleichsmöglichkeiten in der Literatur für BG-1-Zellen.

Auswirkungen von Celecoxib auf SKOV-3-Zellen im FACS

Die Inkubation der SKOV-3-Zellen mit Celecoxib führte zu einer leichten Zunahme der G₁-Phase. Die Rate an abgestorbenen Zellen blieb bei 2-3% annähernd konstant. Die Induktion eines G₁-Arrests lässt sich aus diesen Zahlen jedoch nicht ablesen.

Song, Y.C. et al. (154) beschrieben für SKOV-3-Zellen bei Inkubation mit 40µM Celecoxib einen Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase mit einem Zuwachs auf 30% gegenüber der Kontrolle mit 10%. Im Gegensatz dazu betrug der hier ermittelte G₂/M-Phasen-Anteil in der Kontrolle bereits 43% und fiel bei Inkubation mit Celecoxib auf 35%.

Hier herrscht also eine starke Diskrepanz zur Literatur. Dies könnte auf unterschiedliche Behandlung der Zellen in der Vorbereitung und / oder auf unterschiedliche Inkubationszeiten zurückzuführen sein.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass Celecoxib die in den Konzentrationsversuchen beobachtete Wachstumshemmung in SKOV-3-Zellen nicht durch gesteigerten Zelltod oder einen Phasenarrest induziert. Der Mechanismus bleibt also unklar.

Vergleich mit der Literatur:

Zu Ovarialkarzinomzelllinien gibt es leider wenig Information über die Veränderung der Verteilung der Zellen auf den Zellzyklus nach Behandlung mit Celecoxib.

Bijmann, M.N. et al. (15) untersuchten die Ovarialkarzinomzelllinie H134 und konnten

zeigen, dass eine Behandlung mit Celecoxib die Verteilung der Zellen auf den Zellzyklus nicht veränderte, was in Analogie zu den Ergebnissen bei den SKOV-3-Zellen steht. Hier ein tabellarischer Überblick (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) für beschriebene Zellzyklus-Effekte von Celecoxib auf andere Krebszelllinien:

Tabelle 32: Überblick der Beeinflussung des Zellzyklus durch Celecoxib

Zelllinie	Celecoxib-Dosierung	Zellzyklus	Autor
HCT-5 (Kolon-Ca)	50, 75 μ M	G ₀ /G ₁ -Arrest	Sabine Grösch et al. (51)
Caco-2 (Kolon-Ca)	50, 75 und 100 μ M	G ₀ /G ₁ -Arrest	
HT-29 (Kolon-Ca)	50, 75 μ M	G ₀ /G ₁ -Arrest	
LN 229 (Glioblastom)	35, 70 μ M	G ₀ /G ₁ -Arrest	Kardosh, A. et al. (63)
Prostata-Ca	10,20,30,40 μ M	G ₀ /G ₁ -Arrest	Narayanan et al. (105)
JF-305 (Pankreas-Ca)	Nicht bekannt	G ₁ /S-Arrest	Wu, G. et al. (181)
MDA-MB-468 (Mamma-Ca)	40, 60 μ M	G ₀ /G ₁ -Arrest	Basu et al. (9)

Hier sieht man also, dass Celecoxib bei den meisten Tumorzelllinien einen G₁-Arrest erzeugt. Dies kann man nur in stark abgeschwächter Form aus den FACS-Ergebnissen der SKOV-3- und BG-1-Zellen herauslesen.

Fazit:

Die Integration der hier gewonnenen Daten in die bereits bestehende Literatur lassen vermuten, dass die Reaktion von Malignomzellen auf Celecoxib bezüglich des Zellzyklus sehr stark abhängig ist von den Eigenschaften der behandelten Krebszellen.

Analyse der FACS-Untersuchungen bei Kombination der Medikamente:

Die Kombination beider Medikamente führte nicht zur Verstärkung der Effekte der einzelnen Medikamente. Ausschlaggebend für die Zellzyklus-Phasenverteilung war das Medikament in der „relativ“ höheren Dosierung.

Die in den Proliferationsversuchen beobachteten additiven und synergistischen Effekte

kommen wahrscheinlich nicht durch eine gleichsinnige Beeinflussung des Zellzyklus durch die beiden Medikamente zustande.

Es ist erstaunlich, dass es dennoch zu synergistischen Effekten kommt, auch in den hier verwendeten Konzentrationen. Dies untermauert die These, dass die Beeinflussung des Zellzyklus von Krebszellen nicht der einzige Angriffsort von antikanzerogenen Substanzen ist und dass anderen Mechanismen gleichermaßen Aufmerksamkeit verdienen.

4.1.6) Interpretation der Annexin-Analyse auf Basis der FACS-Ergebnisse

Dank der Annexin-Färbung können die Zellen, die sich in der FACS-Analyse im Sub-G₁-Bereich befinden, genauer differenziert werden.

Flavopiridol

Zusammenfassung der Ergebnisse

Flavopiridol führt bei SKOV-3-Zellen und BG-1-Zellen zu Apoptose und massivem Zelluntergang.

Interpretation für BG-1-Zellen behandelt mit Flavopiridol:

Auf die Behandlung mit Flavopiridol reagieren die BG-1-Zellen deutlich. Durch die Zugabe von 0,1µM Flavopiridol halbiert sich die Fraktion von vitalen Zellen von 77% auf 38%, die nekrotische Fraktion vervierfacht sich von 9% auf 36%, die Apoptose-Fraktion verdoppelt sich von 11% auf 22%.

Das heißt, Flavopiridol übt seine wachstumshemmenden Effekte auf BG-1-Zellen durch die Induktion von Nekrose und Apoptose aus.

Interpretation für SKOV-3-Zellen behandelt mit Flavopiridol:

Die SKOV-3-Zellen reagieren bezüglich des Zellzyklus wesentlich sensibler auf Flavopiridol als auf Celecoxib (s.o.). In der Annexin-Färbung bestätigt sich dies durch eine deutliche Abnahme der Fraktion an vitalen Zellen (Kontrolle 91%; Flavo 0,25µM: 76%; Flavo 0,5µM: 69%). Dafür vervielfacht sich der Anteil an nekrotischen Zellen von 2 % auf 10%, die apoptotische Fraktion vervierfacht sich gut von 4% auf 17%.

Flavopiridol ist also in der Lage, bei SKOV-3-Zellen Apoptose zu induzieren. Die wachstumshemmenden Effekte der Substanz auf SKOV-3-Zellen lassen sich durch das Herbeiführen von Zelltod sowohl in Form von Nekrose als auch Apoptose erklären.

Tabelle 33: Induktion von Apoptose durch Flavopiridol, Vergleich mit der Literatur

Zelllinie	Flavopiridol-Dosis	Apoptose (-rate)	Autor
AO (Ovarial Ca)	300nM	+ (10,7%)	Song, Y.C. et al. (154)
OCA-1 (Ovarial Ca)	50-300nM	Von 1,3% auf 22,5%	Raju et al. (116)
Zwei Keimzelltumoren des Ovars (NT2, 2102 EP)	50,100 nM	+	Mayer et al. (96)
Glioblastome (sieben verschiedene Zelllinien)	Nicht beschrieben	+	Alonso et al. (7)
Lungen-Adeno-Ca	300nM	+	Honoki et al. (57)
Osteosarkom	300nM	+	
CLL (JVM-2, I83CLL, WSU-CLL)	200-400nM	+	König et al. (69)

Die Literatur liefert hier, seien es Malignome des Ovars oder andere Malignome, ähnliche Werte.

Celecoxib

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Für Celecoxib und die SKOV-3-Zellen bestätigten sich die Ergebnisse aus den FACS-Analysen.

In den BG-1-Zellen induziert Celecoxib eindeutig Apoptose.

Celecoxib erhöht nicht die Apoptose-Rate bei SKOV-3-Zellen. Es scheint protektiv auf sie zu wirken.

Interpretation für BG-1-Zellen behandelt mit Celecoxib

Bei den BG-1-Zellen führt die Gabe von Celecoxib v.a. in der Dosis von 50µM zu einer deutlichen Abnahme der Fraktion von vitalen Zellen von 77% auf 63%. Dies geschieht v.a. zu Gunsten der nekrotischen und apoptotischen Zellfraktionen, die von 9% auf 16% und von 11% auf 18% anwachsen.

Im Unterschied zu den SKOV-3-Zellen (s.u.) induziert die Behandlung mit Celecoxib 50µM eindeutig Apoptose bei den BG-1-Zellen.

Interpretation für SKOV-3-Zellen behandelt mit Celecoxib

Bei Behandlung mit 25µM Celecoxib bleibt der Anteil an vitalen Zellen konstant, der Anteil an nekrotischen Zellen verdoppelt sich relativ gesehen von 2% auf 4%, die Apoptose-Fraktion bleibt mit 4% exakt gleich. Auch bei der hohen Celecoxib-Konzentration (50µM) bleibt der Anteil an apoptotischen Zellen konstant. Hieraus folgt, dass Celecoxib bei SKOV-3-Zellen nicht Apoptose induziert. Mögliche Ursachen für das unterschiedliche Ansprechen der beiden Zelllinien auf Celecoxib sind in der Beschaffenheit und genauen Charakterisierung dieser beiden Zelllinien zu suchen.

Literaturvergleich

Die Aussage, dass Celecoxib in SKOV-3-Zellen nicht Apoptose induzieren kann, steht teilweise im Widerspruch zu der bis jetzt veröffentlichten Literatur.

So stellte Wang, H.J. (176) bei Zugabe von 50µM Celecoxib zu SKOV-3-Zellen eine Steigerung der Apoptoserate um 47,5 relative Prozentpunkte fest. Ein Vergleich des Versuchsaufbaus ist nicht möglich, da der vollständige Artikel bis jetzt nur auf Chinesisch vorliegt. Auch Vital-Reyes et al. stellten eine signifikante Steigerung der Apoptoserate (mit Hilfe der Kaspase-3-Expression) für SKOV-3-Zellen bei Behandlung mit Celecoxib 50µM fest (172).

In den hier durchgeführten Versuchen übte Celecoxib hingegen einen fast protektiven Effekt auf die SKOV-3-Zellen aus. Dies könnte an den Versuchsbedingungen liegen. Das Wirkungsoptimum für die mit Celecoxib behandelten SKOV-3-Zellen lag in den Zeitversuchen erst nach zwei bis vier Tagen vor, während die Inkubationszeit hier nur 24 Stunden betrug. Der optische Aspekt der Zellen in den Gewebekulturflaschen – nach dieser kurzen Inkubationszeit - war auffällig gut. Song, Y.C. et al. (154) wiederum bemerkten keine Veränderung des Sub-G₁-Bereichs in ihren FACS-Analysen. Dies unterstützt die hier erhobenen Daten.

Fazit:

Die Angaben in der Literatur zu Apoptose-induzierender Wirkung von Celecoxib für SKOV-3-Zellen sind widersprüchlich. Die teilweise nachgewiesene Apoptose-Induktion (Vital-Reyes) konnte in diesen Experimenten nicht bestätigt werden.

Die Widersprüche können sich vielleicht dadurch erklären, dass unterschiedliche Endpunkte als Indikatoren für Apoptose benutzt wurden (Song: Sub-G₁-Gipfel; Vital-Reyes: Expression der gespaltenen Caspase 3; hier: Annexin-Färbung).

Tabelle 34: Induktion von Apoptose durch Celecoxib, Vergleich mit der Literatur

Zelllinie	Celecoxib	Apoptose	Autor
HCT-15 (Kolon-Ca)	100µM	+	Grösch, S., Tegeder et al. (51)
Caco-2 (Kolon-Ca)	100µM	+	
HT-29 (Kolon-Ca)	50µM	+	
Prostata-Ca	40µM	Von <10 auf >40%	Narayanan et al. (105)
JF-305 (Pankreas-Ca)	Nicht bekannt	+	Wu, G. et al. (181)
MDA-MB-231 (Mamma-Ca), aggressive Zelllinie	60µM	Von <10% auf >20%	Basu et al. (9)
SKOV-3-Zelle null type p53 (Ovarial-Ca)		- - Sub-G ₁ : 6,69%	Song, Y.C. et al. (154)
PA- wild type p53 (Ovarial-Ca)		++ Sub-G ₁ : 60,28%	
SKOV-3		-	Wang, H.J. (176)
SKOV-3		++	Vital-Reyes (172)

Bewertung der Kombinationsversuche mit Annexin

BG-1-Zellen:

Die Annexin-Färbung liefert Hinweise für ein positives Zusammenwirken beider Substanzen im Gegensatz zur FACS-Analyse. Die Fraktion an vitalen Zellen ist jeweils in den Kombinationsversuchen deutlich geringer als in den Versuchen mit den jeweiligen Einzelsubstanzen:

Flavo 0,03µM 71%, Cele 50µM 63%, Kombination 48%.

Flavo 0,1µM 38%, Cele 25µM 7%, Kombination 26%.

Die Verteilung auf die genauen „Sterbestadien“ der Zellen ist unterschiedlich. Die höchste Apoptoserate liegt vor bei Inkubation mit 0,1µM Flavopiridol allein und zwar bei 22% (Kontrolle 11%).

Zusammenfassend gilt also für die BG-1-Zellen, dass Celecoxib und Flavopiridol positiv zusammenwirken, wenn man als Ziel den Untergang von möglichst vielen vitalen Zellen definiert, auch wenn sich dies in den FACS-Analysen nicht zeigte.

SKOV-3-Zellen:

Im Gegensatz zur FACS-Analyse gibt es Anzeichen für ein Zusammenwirken der Medikamente. Beide Kombinationen (1=Flavo 0,25µM + Cele 50µM und 2=Flavo 0,5µM + Cele 25µM) führen zu einer deutlichen Abnahme des Anteils an vitalen Zellen. Die Kontrolle beträgt hier 91%, bei Flavopiridol 0,25µM 76% (↓), bei Celecoxib 50µM 95% (↑) und bei der Kombination der beiden 54% (↓↓). Hier müssen die Medikamente also interagieren und positiv zusammenwirken.

Das gleiche gilt an diesem Beispiel auch für die Rate an nekrotischen und apoptotischen Zellen. Letztere beträgt in der Kontrolle 4%, bei Flavo 0,25µM 13% (↑), bei Cele 50µM 2% (↓) und in der Kombination 17% (↑↑). Für die Nekrose-Fraktion ist es noch deutlicher: Kontrolle 2%, Flavo 0,25µM 7% (↑), Cele 50µM 1% (↓), Kombination 18% (↑↑). Ähnliche Konstellationen gibt es auch für das andere Kombinationspärchen. Dadurch wird die aus den Proliferationsversuchen abgeleitete Hypothese, dass Celecoxib und Flavopiridol synergistisch wirken auf SKOV-3-Zellen weiter untermauert und spezifiziert. Die Kombination führt in der Tat zu einem verstärkten Zelluntergang. Diesem liegen eine gesteigerte Apoptoserate und vermehrte Zellnekrose zugrunde. Der protektive Effekt, der bei alleiniger Celecoxib-Behandlung auftrat, wird durch die Kombination komplett ausgeschaltet.

4.1.7) Western Blotting**4.1.7.1) AKT****AKT und Flavopiridol:**

Ob Flavopiridol die Proteinexpression von nicht-aktiviertem AKT überhaupt beeinflussen würde, war schwer vorherzusehen. In seiner Rolle als Transkriptionshemmer wäre eine verminderte Expression von AKT denkbar. Umso überraschender war das Ergebnis.

Bei den SKOV-3-Zellen kam es dosisabhängig zu einer deutlich vermehrten Expression (0,25µM Flavo → Verdopplung, 0,5µM → Vervierfachung) von AKT. Das lässt vermuten, dass SKOV-3-Zellen auf bestimmte Substanzen mit starken Gegenregulierungsmaßnahmen reagieren können, vielleicht sogar besondere Fähigkeiten besitzen, um Chemoresistenzen zu erwerben.

Die BG-1-Zellen reagierten bei Behandlung mit 0,03µM Flavopiridol mit einer verdoppelten Expression von AKT, in der höheren Dosierung (0,1µM) mit einer

Halbierung der Expression. Vielleicht existiert eine Schwellenkonzentration für Flavopiridol in BG-1-Zellen, ab der für die Zellen nicht mehr die Möglichkeit besteht, der AKT-Supprimierung entgegenzuwirken.

Für Flavopiridol gibt es keinen eindeutigen Nachweis für eine direkte Hemmung des AKT-Signalweges.

Takada et al. berichten, dass Flavopiridol über die Hemmung der Aktivität von p-Akt die Aktivierung des NF-kappa-B beeinträchtigt (160). Für diese Dissertation besonders interessant ist der Nachweis synergistischer Effekte für die Kombination von Flavopiridol mit einem Hemmer der PI3-Kinase (=LY294002) in Leukämiezellen, von Yu, C. et al (185) beschrieben. Die PI3K ist eines der entscheidenden Enzyme, damit es überhaupt zur Aktivierung von AKT kommt.

AKT und Celecoxib. Erwartungen und Ergebnisse:

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften von Celecoxib, die PDK-1 zu hemmen, ein zentrales Enzym zur Aktivierung von AKT/PKB, würde man bei Behandlung der Zellen mit Celecoxib einen verminderten Anteil an aktiviertem (=phosphoryliertem AKT) erwarten. Ein selektiver Protein-Nachweis von phosphoryliertem AKT konnte leider in dieser Dissertation nicht durchgeführt werden.

Mit dem Nachweis der Protein-Expression von AKT in nicht phosphoryliertem und phosphoryliertem Zustand kann man Schlussfolgerungen über die Translation der *Akt*-Gene anstellen. Hier wäre durch Celecoxib-Behandlung durchaus eine Verstärkung der Translation denkbar, da das vorhandene AKT wahrscheinlich weniger häufig aktiviert wird (i.S. eines positiven Feedback-Mechanismus). Andererseits könnte es durch die generelle Wachstumshemmung und durch die Herunter-Regulierung eben dieser Kaskade auch zu einer allgemeinen Translationshemmung kommen.

Bei den SKOV-3-Zellen wird vor allem bei Behandlung mit der hohen Celecoxib-Konzentration eine deutlich verstärkte Expression des AKT-Proteins sichtbar, so dass diese Zellen also wirklich i.S. einer positiven Feedback-Aktivierung einer AKT-Supprimierung entgegenzuwirken scheinen. Hierin könnte auch eine Ursache für das insgesamt wesentlich schwächere Ansprechen der SKOV-3-Zellen auf Celecoxib-Behandlung liegen.

Für die BG-1-Zellen stellt man bei Inkubation mit 25µM und 50µM Celecoxib eine Halbierung der Proteinexpression von AKT fest, so dass man davon ausgehen kann, dass die allgemeine Hemmung der Proteintranslation überwiegt bzw. dass keine

Feedbackschleife existiert. Das heißt, in BG-1-Zellen hemmt Celecoxib die AKT-Expression.

Tabelle 35: Celecoxib-Effekte auf die AKT-Expression, Vergleich mit der Literatur:

Zelllinie	Celecoxib	Akt/PKB	Autor
Kolon-Ca HT-29	100µM	Phosphorylierung ↓	Arico S. et al. (8)
3 Cholangiokarzinom-Zelllinien	50-75µM	Phospho-Akt↓	Wu T. et al. (182)
HCC Zellen (3Linien)	50µM	Phosphp-AKT↓	Leng J. et al. (78)
Prostata-Ca-Zellen (3Linien)	50µM	Phospho-AKT↓	Hsu AL et al. (58)

Akt und Synergismus

Die oben bereits erwähnte synergistische Interaktion von Flavopiridol mit einem PI3K-Hemmer macht Hoffnung auf eine synergistische Wirkung der hier verwendeten Substanzen. Yu, C. et al. (185) wiesen in diesem Zusammenhang eine Abnahme der p-Akt-Konzentration nach.

Bei den BG-1-Zellen führte die Behandlung mit zwei Substanzen zu ähnlichen Ergebnissen wie mit einer Substanz, bei den SKOV-3-Zellen sind die Ergebnisse widersprüchlich.

Bezüglich der AKT-Expression konnte weder für SKOV-3- noch für BG-1-Zellen eine synergistische Wirkung postuliert werden.

Man muss an dieser Stelle kritisch anmerken, dass der Nachweis von p-AKT und AKT die Ergebnisse sicherlich sinnvoll ergänzen könnte.

4.1.7.2) RAS

Die Bedeutung der RAS-Protein-Familie bei Krebserkrankungen wurde in der Einleitung bereits erläutert. Der hier verwendete RAS-Antikörper ist ein pan-Antikörper, der unspezifisch Proteine der RAS-Familie detektiert, unabhängig vom aktuellen Substitutionsgrad mit GTP oder GDP, was „aktiviert“ bzw. „nicht-aktiviert“ entspricht.

Pan-Ras und Flavopiridol:

Lü et al. (87) stellten Untersuchungen zur Genexpression verschiedenster Gene in vier verschiedenen Tumorzellen (Prostata-Ca und Glioblastom) nach Behandlung mit Flavopiridol an, darunter waren auch drei Mitglieder der Ras-Familie. Für alle untersuchten Subfamilien der Ras-Familie stellte man eine deutliche Verminderung der Genexpression nach Behandlung mit Flavopiridol fest, wie man in Tabelle 36 auf der folgenden Seite sieht.

Tabelle 36 (87): Effekte von Flavopiridol auf die Ras-Expression verschiedener Tumorzellen

Ras-Onkogen-Familie:	PC3 (Prostata-Ca) 300nmol/l	DU 145 (Prostata-Ca) 600nmol/l	SF539 (Gliom) 400nmol/l	U251 (Gliom) 500nmol/l
RAB9A	-2,64fache	-2,00fache	-3,04fache	-4,71fache
RAB1A	-2,48fache	-20,2fache	-5,96fache	-3,68fache
RAB23	-6,14fache	-3,43fache	-10,4fache	-3,53fache

Der Einsatz von Flavopiridol in der Krebsprävention könnte sinnvoll sein, da es z.B. in Brusttumoren über eine Steigerung der Cyclin D-Spiegel zu maligner Transformation via Ras kommen kann (186).

Auch wenn keine Literatur zur Proteinexpression von RAS nach Flavopiridol-Behandlung vorliegt, könnte man aufgrund seiner Eigenschaften als Transkriptionshemmer und der Ergebnisse von Lü et al. vermuten, dass die RAS-Protein-Expression abnimmt.

Die hier ermittelten Ergebnisse sind nicht eindeutig und bestätigen die Vermutungen nur bedingt: So kommt es bei Behandlung der BG-1-Zellen mit der niedrigen Konzentration zu einer Induktion von RAS um das 2,6fache, für die SKOV-3-Zellen bleibt die Expression bei der niedrigen Konzentration konstant. Bei Inkubation mit der höheren Konzentration nimmt die RAS-Expression wie vermutet ab, und zwar in beiden Zelllinien. Das heißt im Gegensatz zur AKT-Expression, reagieren die beiden Zelllinien gleichartig auf die Inkubation mit der höheren Dosis Flavopiridol, nämlich mit Supprimierung der Ras-Gen-Translation.

Pan-ras und Celecoxib. Erwartungen und Ergebnisse

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Celecoxib über eine Steigerung des Ceramidspiegels via den Kinase-Suppressor von RAS die Expression von RAS vermindern könnte (125), zumindest wurde dies für Brusttumorzellen berichtet. Eine weitere Schnittstelle entsteht durch die COX-2-Hemmung. Über RAS-Aktivierung und die daraus folgende Aktivierung der MAPK, wird die Transkription von COX-2 verstärkt (74). Daran schließt sich eine sich selbstverstärkende Verstärkerschleife an, laut Wang, D. et al. (174). Dieser Schleife wirkt Celecoxib entgegen. Dies könnte sowohl durch Unterbrechung der Selbstverstärkung zu einer verminderten RAS-Expression als auch über einen Feedback-Mechanismus zu einer verstärkten RAS-Expression führen. In den hiesigen Untersuchungen reagieren SKOV-3-Zellen auf Behandlung mit Celecoxib, v.a. in der hohen Dosierung mit einer deutlichen Überexpression, dies würde die oben aufgestellte Hypothese eines Feedbackmechanismus unterstützen und könnte auch das schlechtere Ansprechen der SKOV-3-Zellen auf Celecoxib erklären. Dies stellt eine Parallelität zur AKT-Expression dar. Bei den BG-1-Zellen ändert sich insgesamt nicht viel an der Ras-Expression. Celecoxib beeinflusst die Protein-Expression von RAS in BG-1-Zellen nicht.

Ras und Synergismus:

Im Synergismus scheint bei den SKOV-3-Zellen bei Verwendung der hohen Celecoxib-Konzentration der RAS induzierende Effekt zu überwiegen, dieser wird aber in Anwesenheit von Flavopiridol deutlich abgeschwächt. Dies könnte z.B. ein Mittel sein mit Hilfe von Kombinationstherapien der Entwicklung von Resistenzen entgegenzuwirken, denn die Antwort der SKOV-3-Zellen auf alleinige Celecoxib-Behandlung scheint hier abgeschwächt zu werden.

Bei den BG-1-Zellen kann man das gleiche für die RAS-induzierende Wirkung der niedrigen Flavopiridol-Dosis beobachten. Celecoxib, das für sich allein genommen die RAS-Expression in BG-1-Zellen nicht wesentlich verändert, schwächt die Induktion von Flavopiridol ab.

4.2) Auswahl der Substanzen

4.2.1) Celecoxib

Warum Einsatz in der Krebstherapie?

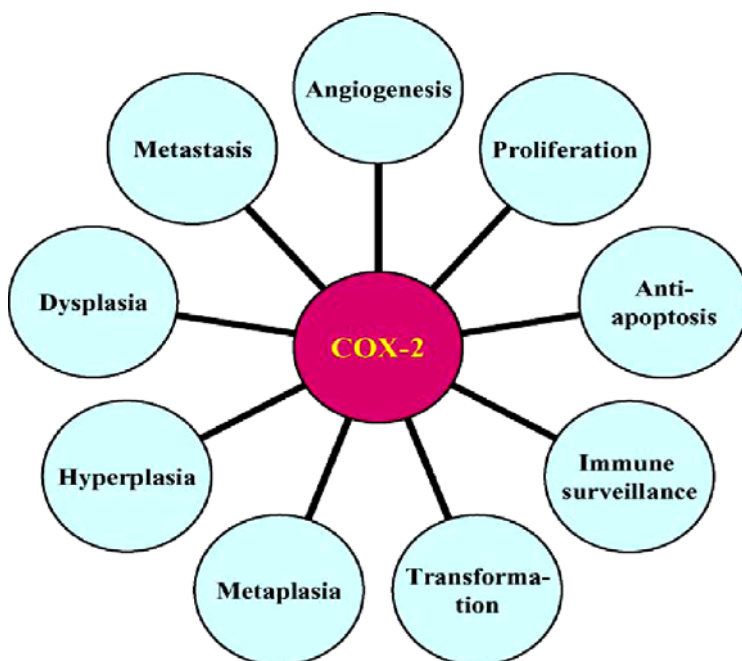


Abbildung 46 aus (74): COX-2-vermittelte Effekte

Kyung-Soo, C. et al. schreiben dem COX-2-Enzym eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Tumoren zu (s. Abbildung 46). Eine anomale COX-2-Expression findet sich häufig bei humanen Neoplasien. Deswegen erscheint die Hemmung der COX-2 einen sinnvollen Ansatz in der Tumorprävention darzustellen (74).

Klassische Chemotherapeutika und Bestrahlung induzieren die Bildung der COX-2 und die Synthese von Prostaglandin E₂ in menschlichen Lungenkrebszellen (Helliwell et al. (56)). Fürstenberger et al. vermuten, dass diese Ereignisse für die Entwicklung von Resistenzen verantwortlich sein könnten und dass eine adjuvante Therapie mit COX-2-Hemmern die therapeutische Wirksamkeit von klassischen Chemotherapeutika und Bestrahlung verbessern könnte (47).

Einsatz beim Ovarial-Karzinom

In der Literatur gibt es viele Hinweise darauf, dass die COX-2 eine wichtige Rolle spielt beim Ovarialkarzinom:

So ist laut Raspollini et al. (117) eine erhöhte COX-2-Expression in Adenokarzinomen der Ovarien mit einer erhöhten Chemotherapie-Resistenz-Rate und schlechter Prognose assoziiert. Untersuchungen von Denkert et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die COX-2 ein unabhängiger prognostischer Faktor bei Ovarialkarzinomen ist und stellten eine Therapie mit COX-2-Hemmern bei Patienten mit COX-2-positiven Tumoren in Frage (37).

Immunhistochemische Analysen von 173 Ovarialtumoren zeigten starke COX-2-Immunoreaktivität bei 63% der untersuchten Tumoren (159). Daraus resultierten weitere Untersuchungen von Symowicz et al. (159), die ergaben, dass die COX-2 als ein stromabwärts gelegener Mediator der Lysophosphatsäure fungiert und aggressives Verhalten von Ovarialkarzinomzellen fördert. Ali-Fehmi, R., Morris, R.T. et al. wiesen nach, dass die Expression der COX-2 in fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinomen positiv mit der Tumorphilierung und Tumorangienese korreliert (5).

Auch zur Rolle der COX-1 beim Ovarialkarzinom existieren Publikationen: Gupta et al. entdeckten eine Überexpression der COX-1 in Ovarialkarzinomen, die mit einer Steigerung der angiogenetischen Wachstumsfaktoren einherging (54). Taikiko Daikoku et al. fanden beim epithelialen Ovarial-Karzinom im Mäusemodell eine Überexpression von COX-1. Die Behandlung mit einem selektiven COX-1-Hemmer führte hier zu einer Reduktion des Tumorwachstums, während Celecoxib hier wenig wirksam war (32).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Forschung zum Einsatz selektiver COX-2-Hemmer in der Behandlung des Ovarialkarzinoms wichtig ist und auch in Zukunft unbedingt weiterverfolgt werden sollte, so wie dies auch die Ergebnisse dieser Dissertation nahe legen.

Nur ein gewöhnlicher COX-2-Hemmer, oder überwiegen doch andere Effekte?

Celecoxib wurde als selektiver COX-2-Hemmer ursprünglich für die Schmerz- und Entzündungstherapie entwickelt.

Zu den für die antitumoröse Wirksamkeit verantwortlichen molekularen Mechanismen gibt es unterschiedliche Meinungen. Bekannt ist, dass Celecoxib antiproliferativ wirkt, Zellzyklus-Arrest erzeugt und Apoptose induziert. Aber beruhen diese Effekte auf einer Hemmung der COX-2 oder auf der Hemmung anderer Enzyme?

Die Publikation der letzten Zeit beschäftigen sich v.a. mit den COX-2-unabhängigen

Mechanismen (z.B. (51)). Entscheidend sind hier die Hemmung der PKB und der SERCA.

Aber auch die Rolle der Cyclooxygenasen und damit einhergehender erhöhter Prostaglandin-Spiegel sollte nicht unterschätzt werden (z.B. (47)).

Eine Entscheidung zugunsten der einen oder anderen Theorie kann im Rahmen dieser Dissertation nicht gefällt werden. Interessanter sind hier aber eindeutig die COX-2-unabhängigen Effekte, da sie mehr potentielle Schnittstellen für eine synergistische Wirkung mit Flavopiridol bergen.

Die Bedeutung der COX-2-abhängigen und –unabhängigen Effekte in ihrer Ausprägung können in der unterschiedlichen Expression der COX-2 begründet sein, wie Tabelle 37 veranschaulicht.

Tabelle 37: Unterschiedliche Expression der COX-2 in SKOV-3-Zellen

Zelllinie	COX-2	COX-1	Quelle
SKOV3	+	-	Gupta, R.A. et al 2003 (54)
SKOV3	-	-	Denkert, C., Fürstenberg, A. et al, 2003 (36)
SKOV3	+		Zhu, G. et al 2004 (191)
SKOV3	-	+	Li, S. et al. 2004 (80)
BG1	-	++	“ “
SKOV3	+		Munkarah, A.R. et al. 2002 (103)
SKOV3	-	+ nach Stimulation Mit IL-1-β	Denkert, C., Köbel, M. et al. 2002 (37)
SKOV3	+		Vital-Reyes, V. et al. 2005 (172)
SKOV3	+	+	Rodriguez-Burford, C. et al. 2002 (123)
SKOV3	-		Symowicz et al. (159)
SKOV3	+ nach Stimulation mit IL-1-alpha		Gubbay et al. 2005 (53)
BG1	- (auch nach Stimulation mit IL-1-α)		

Der *in vitro*-versus- *in vivo* Konflikt oder die Frage der klinischen Relevanz

Da viele COX-2-unabhängige Effekte von Celecoxib nur bei hohen Konzentrationen (10 μ M-100 μ M) auftreten, wie z.B. die Stimulation des endoplasmatischen Retikulum Stress Response, stellt sich die Frage, ob diese Effekte auch *in vivo* eine Relevanz besitzen, wo die Konzentration meist unter 5 μ M liegt.

Diese Diskrepanz kann erklären, dass die Tumorregression bei Patienten oder Tieren wochen- oder monatelange Behandlungen erfordert, während die antiproliferativen Effekte *in vitro* schon nach einigen Stunden beobachtet werden (89). Einen Lösungsansatz entwickelten Patel et al., die feststellten, dass Celecoxib in Prostatakarzinomzellen einen antiproliferativen Effekt auch in niedrigeren Konzentrationen (2,5 μ M-10 μ M) besitzt, wenn man die Inkubationszeit entsprechend verlängert (110).

Ausblick:

Trotz des kritischen Nebenwirkungsprofils könnte die weitere klinische Prüfung von Celecoxib in der Krebstherapie angezeigt sein, da es eine Alternative zu den klassischen Chemotherapeutika oder eine Ergänzung selbiger sein kann (s. auch oben (117)). Die Datenlage zu einem Anstieg kardiovaskulärer Ereignisse bei Einsatz von Celecoxib in der Krebstherapie ist nicht eindeutig. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die hier verwendeten Behandlungsschemata anders sind, als die in der Schmerz- und Entzündungstherapie verwendeten. Die Perspektive einer an fortgeschrittenem Ovarialkarzinom erkrankten Patientin lässt sich nicht vergleichen mit der einer an Rheumatoider Arthritis erkrankten Person, besonders was ihre Lebenserwartung betrifft. Der Einsatz von Celecoxib könnte z.B. in Fällen von Ovarialkarzinom mit erworbener Platinresistenz geprüft werden. Die für Celecoxib festgestellten krebpräventiven Effekte müssen natürlich in Hinblick auf das Nebenwirkungsprofil kritisch betrachtet werden. Ein weiterer Ansatz für die Zukunft ist die Entwicklung von Celecoxib-Derivaten, die z.B. die PDK-1-hemmende Wirkung von Celecoxib besitzen, aber nicht die COX-2-hemmende, auf die wahrscheinlich die kardiovaskulären Nebenwirkungen zurückzuführen sind. Dies ist auch schon zum Teil geschehen, wie z.B. die Entwicklung von OSU- 03012 (192) oder 2,5 Dimethyl-Celecoxib (115).

Den konträren Weg schlagen Luo, C. et al. vor, die eine wichtige Rolle für COX-2-Hemmer gerade bei Tumoren mit einer Überexpression der COX-2 vermuten (88).

4.2.2) Flavopiridol

Warum Einsatz in der Krebstherapie?

Flavopiridol ist ein pan-CDK-Hemmer. CDKs sind Cyclin-dependent-Kinasen, Schlüsselenzyme des Zellzyklus. Veränderungen im Zellzyklus sind verantwortlich für die meisten humanen neoplastischen Erkrankungen. Dies geschieht häufig durch Hyper-Phosphorylierung des Tumor-Suppressor-Gens Rb, und zwar durch Cyclin-dependent-Kinasen (168). Dies führt zur Inaktivierung der Rb-Proteine, die normalerweise E2F-Transkriptionsfaktoren festhalten und dadurch die Aktivierung entscheidender Gene der Zellproliferation hemmen.

Bei den meisten humanen Neoplasien finden sich Anomalitäten an irgendeinem Punkt des Rb-Pfades. Dies kann verursacht sein durch Hyperaktivität der CDKs, durch verminderte Expression von endogenen CDK-Inhibitoren oder Mutationen im Rb-Gen-Produkt. Diese Fehlentwicklungen fördern eine deregulierte Progression der Zellen in die S-Phase ohne Rücksicht auf Signale von Wachstumsfaktoren oder Durchlaufen des G₁-Checkpoints (148).

Diskussion der Wirkmechanismen: Was überwiegt: die allgemeine CDK-Hemmung oder die Hemmung der Transkription?

Auch hier existieren - ähnlich wie bei Celecoxib - in der Literatur differierende Aussagen, welche Mechanismen für die antikarzinogene Wirkung von Flavopiridol ausschlaggebend sind. Ist es der Ausfall der CDKs, die für das Fortschreiten des Zellzyklus verantwortlich gemacht werden, oder bestimmt die Transkriptionshemmung die Effekte von Flavopiridol?

Die allgemeine Hemmung von CDKs durch Flavopiridol beinhaltet auch die Hemmung der CDK 7, 8 und 9. Diese sind wichtige Regelgrößen der Transkriptionskontrolle (118), (128).

Flavopiridol blockiert stark die Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerase II in vitro durch Bindung von CDK9/Cyclin T, was auch als P-TEFb (= positiver Elongations-Transkriptions Faktor b) bekannt ist. Diese Hemmung ist stärker ausgeprägt als die anderer CDKs und kann im Gegensatz zur Hemmung anderer CDKs nicht durch ATP aufgehoben werden (28).

Eines der wichtigsten Proteine, das Flavopiridol durch die Transkriptionshemmung in seiner Expression vermindert, ist Cyclin D1 (75). Besonders betroffen sind die Proteine,

deren mRNAs nur eine kurze Halbwertszeit besitzen.

Daraus folgert Blagosklonny, dass Flavopiridol ein ganz gewöhnlicher zytotoxischer Wirkstoff ist, dessen pleiotrope Effekte (Zellzyklus-Arrest, Apoptose etc.) nur durch die Hemmung eines einzigen Endpunktes erklärt werden können: durch Hemmung von P-TEF (16).

Andererseits kann man den Zellzyklusarrest - entweder in der G₁- oder in der G₂/M-Phase - durch die bloße Hemmung der entsprechenden CDKs erklären. So scheint z.B. die Hemmung der CDK-4 und -6 für den G₁-Arrest verantwortlich zu sein (144).

Allerdings konnte später bewiesen werden, dass diese beiden CDKs für das Zellwachstum entbehrlich sind. Zum Beispiel relativierte sich die zentrale Rolle der CDK-2 beim Übergang von der G₁- zur S-Phase: Diverse Krebszelllinien konnten nach gezielter Zerstörung der CDK-2 trotzdem weiter proliferieren (167). Auch die CyclinD-cdk4/6-Komplexe scheinen nicht essentiell für den Austritt von Zellen aus der Ruhephase zu sein. Ihre Abwesenheit kann durch Akkumulation von CyclinD-cdk2-Komplexe kompensiert werden (92). Die Fähigkeit der CDKs, sich ersetzen zu können, wirft die Frage auf, ob die selektive Hemmung einzelner CDKs überhaupt zu Erfolgen führen kann.

Deswegen ist der Einsatz eines pan-CDK-Inhibitors wie Flavopiridol, der zusätzlich oder insbesondere die Transkription beeinflussen kann, sehr vielversprechend. Die hier gewonnenen Daten lassen kaum Rückschlüsse darauf zu, welche molekularen Mechanismen der nachgewiesenen Beeinflussung von Zellwachstum, Zellzyklusphasenverteilung, Apoptose und Proteinexpression zugrunde liegen. Für die zukünftige Forschung zu diesen Substanzen, wäre eine noch weitergehende Differenzierung und Aufschlüsselung der Wirkmechanismen hilfreich.

Scheitern in der Klinik?! / *in vivo*- versus- *in vitro* Konflikt / Pharmakologie

Nach Jahren intensiver Forschung und großer Versprechungen hat Flavopiridol bis jetzt in den meisten klinischen Versuchen versagt (16). Hierfür gibt es viele Erklärungsversuche:

Laut Byrd, Peterson et al. könnte die geringe Konkordanz zwischen den vielversprechenden *in vitro*-Ergebnissen und den enttäuschenden klinischen Ergebnissen auf eine verstärkte Plasmaproteinbindung von Flavopiridol beim Menschen im Gegensatz zum *in vitro* verwendeten FCS (Fetales Kälber Serum) zurückzuführen sein (23).

Es existieren bereits mehrere Verabreichungsformen. Bei Verabreichung über 72 Stunden

als Infusion erreichte Flavopiridol im Plasma konstante Spiegel von 270nM-415nM, bei Verabreichung als einstündige Infusion lag der mittlere Spitzenwert der Plasma-Konzentration zwischen 1,7µM - 3,8µM (31), (189), (30). Diese klinisch erreichten Konzentrationen liegen beide deutlich über den *in vitro* benötigten Konzentrationen, um CDKs und Proliferation zu hemmen und Apoptose zu induzieren (31), (189), (30). Doch was die klinische Effektivität angeht, scheint es, dass das Bolus-Schema oder die Kombination aus Bolus + Dauerinfusion mit höheren Plasmaspiegeln den Dauerinfusionen über 24 oder 72 Stunden überlegen sind, was in Zusammenhang mit den menschlichen Plasmabindungseigenschaften stehen könnte (127), (23), die für Flavopiridol 92-95% betragen (124), (152).

Einen weiteres mögliches Problem erörtern Malumbres et al.: Sie machen darauf aufmerksam, dass ein grundlegendes Problem bei der Behandlung von Krebs die Heterogenität der Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Verteilung auf den Zellzyklus darstellt. Daraus folgt, dass ein reversibler Zellzyklushemmer wie Flavopiridol über einen längeren Zeitraum präsent sein muss, um möglichst viele Zellen zum geeigneten Zeitpunkt zu treffen. Die geschätzte Verdopplungszeit für eine Ovarialkarzinomzelle liegt bei 5-6 Tagen. Das bedeutet, dass die Tumorzellen idealerweise einem Zellzyklus-Hemmer mit konstanter Plasma-Konzentration über 5-6 Tage ausgesetzt sein müssten (91).

Das Nicht-Ansprechen oder Scheitern der Flavopiridol-Therapie bei manchen Patienten könnte aber auch daran liegen, dass Resistenzentwicklungen gegenüber Flavopiridol im klinischen Rahmen eine Rolle spielen (10).

Gerade für den Einsatz von Flavopiridol, v.a. in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika, ist die Bedeutung des Verabreichungsmodus essentiell. Auch in Kombination mit Celecoxib wäre es (*in vitro*) interessant, verschiedene Verabreichungsmodi zu untersuchen.

Ausblick

Eine zukünftige Rolle für Flavopiridol kann mit Sicherheit in der Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika oder mit spezifischen Signal-Transduktions-Modulatoren –wie in dieser Dissertation gezeigt- zu finden sein.

Über Synergie zwischen Flavopiridol und Paclitaxel, Cytarabin, Topotecan, Doxorubicin, Etoposid und 5-Fluoro-Uracil *in vitro* wurde bereits berichtet (139). Dies hat sich besonders gezeigt für Medikamente, die Tumorzellen in die S-Phase rekrutieren,

wie z.B. Cisplatin. So werden die Zellen für Flavopiridol sensibilisiert und es kann zu zytotoxischen Synergien kommen (95), (101), (62).

Das Fehlen von Kreuzresistenzen zwischen konventionellen zytotoxischen Wirkstoffen und Flavopiridol bildet laut Sedlacek eine hervorragende Basis für die Entwicklung von Kombinationstherapien (136).

Blagosklonny (16) sieht einen möglichen Einsatzbereich für Flavopiridol, das er als einen reinen Transkriptionshemmer versteht, vor allem in folgenden Tumor-Gruppen:

- a) Apoptose-geneigte Tumoren wie z.B. Malignome des Kindesalters
- b) In Tumoren, die labile anti-apoptotische Proteine exprimieren, wie z.B. Mcl-1
- c) In Tumoren, die Onkogen-abhängig sind.

In der generellen Transkriptionshemmung, die Flavopiridol bewirkt, sieht er auch Chancen für Kombinationen mit anderen Anti-Cancer-Drugs, was die Steigerung der Apoptose-Rate durch Flavopiridol bei Behandlung mit Cisplatin-11 (101), Paclitaxel (100) und Bestrahlung (116) erklären könnte.

Der potentielle Einsatzbereich wird von E. Newcomb (106) erweitert: Sie sieht für Flavopiridol besondere Vorteile in der Behandlung von Malignomen mit hoher angiogenetischer Aktivität, wie z.B. in Nierenzellkarzinomen oder Glioblastomen, wegen dessen Fähigkeit, die Gefäßneubildung zu unterdrücken.

Für die Entwicklung zukünftiger CDK-Inhibitoren bleibt offen, welche CDKs oder welches Spektrum an CDKs gehemmt werden sollte. Das bedeutet aber auch, dass der Konflikt zwischen Spezifität und Wirksamkeit für jeden spezifischen Zelltyp untersucht werden muss, unter Berücksichtigung der möglichen kompensatorischen Funktionen anderer CDKs, fordert Malumbres (91).

Auch Shapiro (144) vertritt die Ansicht, dass noch zu klären ist, ob eine ausgedehnte CDK-Hemmung einer selektiven überlegen ist. Auch er erwartet für Flavopiridol letztendlich einen Platz in Kombinationstherapien mit anderen Chemotherapeutika. Zusammenfassend sieht es so aus, als sei ein großes Feld, was weiterer Forschung bedarf, gerade erst entdeckt worden.

4.3) Mögliche molekulare Schnittstellen beider Medikamente

Wirkungen von Celecoxib und Flavopiridol auf Krebszellen aus. Beide :

- hemmen die Proliferation
- induzieren Zellzyklusarrest
- induzieren Apoptose
- wirken antiangiogenetisch
- beeinflussen die Invasivität von Tumorzellen.

Allein die Ähnlichkeit der Wirkungsprofile rechtfertigt einen gemeinsamen Einsatz der beiden Therapeutika. Die oben aufgeführten Wirkungen können über viele verschiedene Schalter im Mikrosystem „Zelle“ erreicht werden. Celecoxib und Flavopiridol beeinflussen teilweise die gleichen Signalkaskaden. Ursachen für Synergien können sowohl in der Beeinflussung ein und derselben Signalkaskade oder sogar desselben Proteins liegen, als auch durch Manipulation vollkommen unterschiedlicher „Hebel“ im Zellsystem zustande kommen. In diesem Sinne kann man sagen, dass die Wirkmechanismen von Celecoxib und Flavopiridol grundsätzlich verschieden sind, aber letztendlich doch oft die gleichen, vor allem für das Überleben von Krebszellen, essentiellen Abläufe beeinflussen (s. Tabelle)

Ein weiteres wichtiges Argument für eine Kombination der beiden Medikamente sind die bis jetzt in klinischen Studien insgesamt gut tolerierbaren Nebenwirkungsprofile beider Substanzen.

Tabelle 38: Mögliche molekulare Schnittstellen von Celecoxib und Flavopiridol

	Protein	Celecoxib	Flavopiridol
Zellzyklus	Cyclin D	↓ (51)	↓ (106), (24)
	CDK-Aktivität	↓	↓
	Retinoblastoma Protein	Phosphorylierung ↓ (82)	Phosphorylierung ↓ (106)
Apoptose	Bcl-2 (anti-apoptotisch)	↓ (83)	↓ (144)
	Mcl-1	↓ (184)	↓ (144)
	NF Kappa B	Modulation (67), (107)	Eher ↓ (66), (78)
Angiogenese	VEGF	↓ (79)	↓ (97)
Invasivität	Matrixmetall-Proteinasen	MMP9↓ und MMP2↓ (111), (76)	MMP9↓ und MMP2↓ (81), (160)

4.4) Ausblick:

Die Verwendung von medikamentösen Kombinationen in der Krebstherapie wird im Bereich der klassischen Chemotherapeutika / Zytostatika, die leider regelmäßig mit stärksten Nebenwirkungen einhergehen, schon lange praktiziert.

Eine wichtige Alternative und Bereicherung dieser klassischen medikamentösen Therapien stellt der Einsatz von wesentlich nebenwirkungsärmeren Substanzen dar, wie hier von Celecoxib. Es gibt zahlreiche Substanzen wie diese, für die antitumoröse Wirkungen *in vitro* beschrieben werden. Diese nebenwirkungsärmeren Medikamente haben mittlerweile Einzug gehalten in die Therapie, v.a. in die Rezidiv-Therapie. Auch die Lebensqualität bei Patienten die an unheilbaren Tumorleiden erkrankt sind, spielt eine entscheidende Rolle.

Diese Dissertation zeigt, dass die Kombination alternativer Substanzen und neuerer Zytostatika, wie hier Flavopiridol, großes Potential birgt in der Krebstherapie.

Es lohnt sich, auch wenn dies die praktische und theoretische Forschungsarbeit verkompliziert, nach potentiell synergistisch wirkenden Substanzen zu suchen.

In der Literaturrecherche kristallisierte sich vor allem heraus, dass in den *in vivo*-Settings der Verabreichungsformen, -reihenfolgen und -dosierungen noch längst nicht alle Möglichkeiten ausgeschöpft sind.

In dieser Dissertation wird allerdings auch deutlich, dass es „den“ Durchbruch wohl in naher Zukunft in der Krebstherapie nicht geben wird, da schon zwei verschiedene Zelllinien eines Tumortyps auf zwei Medikamente sehr unterschiedlich reagieren. Das Mikrosystem „Zelle“ gibt dem Menschen noch weiterhin viele Rätsel auf. Es gleicht einem Mobilé: zieht man an einem Faden, sieht man alles in Bewegung. Mit dem Unterschied, dass der Mensch bis jetzt von diesen Bewegungen wahrscheinlich nur einen Bruchteil mit seinen Forschungsmethoden erfassen kann.

5) Zusammenfassung

Im Vorfeld dieser Dissertation wurden zwei epitheliale humane Ovarialkarzinomzelllinien (SKOV-3- und BG-1-Zellen) in vitro mit zwei Medikamenten behandelt. Bei den Medikamenten handelt es sich um Celecoxib, einen Hemmer der Cyclooxygenase-2, ursprünglich entwickelt für die analgetische Therapie, z.B. bei Rheumatoider Arthritis, und um Flavopiridol, ein Zytostatikum pflanzlichen Ursprungs. Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Betrachtung des Zusammenwirkens der beiden Medikamente mit der Fragestellung, ob eine synergistische Wirkung vorliegt. Dies geschieht mit Hilfe des Interaktionsindex nach Tallarida. Betrachtet wurde die Zellproliferation in Abhängigkeit von den verwendeten Konzentrationen und der Inkubationszeit. Des Weiteren wurden die Effekte der beiden Medikamente auf den Zellzyklus und die Protein-Expression untersucht.

Ergebnisse:

Die Proliferationsversuche ergaben, dass sowohl Celecoxib als auch Flavopiridol das Wachstum beider Zelllinien hemmen (IC 50-Werte für Celecoxib: 24,5 μ M bei BG-1-Zellen; 56,5 μ M bei SKOV-3-Zellen; für Flavopiridol: 61 nM bei BG-1-Zellen; 63 nM bei SKOV-3-Zellen).

Das Wirkungsmaximum trat in Abhängigkeit von Zelllinie und Medikament nach zwei bis sechs Tagen Inkubationszeit auf.

In den Synergismus-Versuchen zeigten sich nur für ausgewählte Kombinationen synergistische Effekte, insgesamt überwog subadditives Zusammenwirken. Zu signifikanten synergistischen Effekten kam es bei BG-1-Zellen und SKOV-3-Zellen nach Verwendung sowohl hoher Celecoxib- ($\geq 3 \mu$ M) als auch hoher Flavopiridol-Konzentrationen ($\geq 0,03 \mu$ M).

Im Hinblick auf den Zellzyklus führte Celecoxib bei beiden Zelllinien zu einer Zunahme des G₁-Phasen-Anteils sowie zu einer Abnahme des Proliferationsindex, wohingegen Flavopiridol bei beiden Zelllinien zu einer Zunahme der apoptotisch-nekrotischen Fraktion führte.

In dem sich anschließenden Annexin-Versuch konnte bewiesen werden, dass Flavopiridol sowohl bei BG-1- als auch bei SKOV-3-Zellen Apoptose induziert, während Celecoxib nur bei BG-1-Zellen Apoptose induziert.

In den Western Blots wurde die Expression der Proteine AKT und Ras untersucht.

Flavopiridol supprimierte in hoher Dosierung bei BG-1-Zellen die Ras- und die AKT-Expression.

Die Ras-Expression von SKOV-3-Zellen wurde durch Flavopiridol nicht beeinflusst, die AKT-Expression nahm konzentrationsabhängig zu.

Celecoxib führte in hoher Dosierung zu einer Steigerung der Ras-Expression bei BG-1- und SKOV-3-Zellen. Die AKT-Expression der BG-1-Zellen wurde durch Celecoxib konzentrationsabhängig unterdrückt, wohingegen sie bei SKOV-3-Zellen konzentrationsabhängig anstieg.

Ausblick:

Das Ovarialkarzinom ist eine Tumor-Erkrankung, die nach wie vor mit einer sehr hohen Sterblichkeit assoziiert ist. In dieser Dissertation wurde ein neues pflanzliches Zytostatikum mit einem Entzündungshemmer kombiniert. Bei Celecoxib handelt es sich um eine eher nebenwirkungsarme Substanz im Vergleich zu den klassischen Chemotherapeutika. Die gleichzeitige Applikation zweier Medikamente, die synergistisch wirken, hat den Vorteil, dass Nebenwirkungen durch Dosis-Reduktion noch weiter minimiert werden können und dass der gewünschte therapeutische Effekt maximiert werden kann.

Bei den hier vorliegenden *in-vitro* Untersuchungen hat sich gezeigt, dass synergistische Wirkungen nur in bestimmten Konzentrationsbereichen auftreten und dass die Kombination zweier Medikamente auch subadditiv wirken kann.

Beim Transfer solcher *in vitro* gewonnener Daten auf die hoch komplexen Bedingungen *in vivo* liegt großes Potential in der zukünftigen Krebsforschung. Außerdem lohnt es sich auch in Zukunft, nicht nur den klassischen Zytostatika Aufmerksamkeit zu schenken, sondern die Suche auszuweiten auf nebenwirkungsärmere Medikamente, gerade auch bei aggressiven Tumorerkrankungen wie dem Ovarialkarzinom, bei dem neben der Verlängerung der Überlebenszeit auch die Lebensqualität als solche eine entscheidende Rolle für die Erkrankten spielt.

Ein weiteres Ergebnis dieser Dissertation ist das unterschiedliche Ansprechen der beiden Zelllinien auf die Medikamente. Hier wird deutlich, dass es sich bei entarteten Zellen sozusagen um „einzigartige“ Zellen handelt, deren genaue Typisierung von entscheidender Bedeutung ist vor der Auswahl einer medikamentösen Therapie.

6) Literaturverzeichnis

- (1) **AGO und (Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie), Kommission Ovar (2007).** S2k Leitlinie; Version 1.0. - 2007
- (2) **Aklilu, M., Kindler, H.L., Donehower, R.C., Mani, S., Vokes, E.E.:** Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol.* 14(8): S. 1270-3 (2003).
- (3) **Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Cohen, P.:** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biology* 7(4): S. 261-9 (1997).
- (4) **Ali-Fehmi, R., Che, M., Khalifeh, I., Malone, J.M., Morris, R., Lawrence, W.D., Munkarah, A.R.:** The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor vascularity in advanced stage ovarian serous carcinoma. *Cancer* 1, S. 98(7):1423-9 (2003).
- (5) **Ali-Fehmi, R., Morris, R.T., Bandyopadhyay, S., Che, M., Schimp, V., Malone, J.M. Jr., Munkarah, A.R.:** Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival. *Am J Obstetr.* (2005).
- (6) **Alloza, I., Baxter, A., Chen, Q., Matthiesen, R., Vandenbroeck, K.:** Celecoxib inhibits interleukin-12 α and β 2 folding and secretion by a novel COX2-independent mechanism involving chaperones of the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol.* 69(5):1579-87 (2006).
- (7) **Alonso, M., Tamasdan, C., Miller, D.C. and Newcomb, E.W.:** Flavopiridol Induces Apoptosis in Glioma Cell Lines Independent of Retinoblastoma and p53 Tumor Suppressor Pathway Alterations by a Caspase-independent Pathway. *Molecular Cancer Therapeutics.* Vol. 2, S. 139–150 (2003).
- (8) **Arico, S., Pattingre, S., Bauvy, C., Gane, P., Barbat, A., Codogno, P., Ogier-Denis, E.:** Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem* 277: S. 27613 (2002).
- (9) **Basu, G.D., Pathangey, L.B., Tinder, T.L., Gendler, S.J., Mukherjee, P.** Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 7(4): S. R422-35 (2005).

- (10) **Bellacosa, A.J.R., Testa, R., Moore, L.L.:** Review. A Portrait of AKT Kinases. *Cancer Biology & Therapy* 3:3, S. 268-275 (2004).
- (11) **Bible, K.C., Boerner, S. A., Kirkland, K., Anderl, K.L., Bartelt, D. Jr., Svingen, P.A., Kottke, T. J., Lee, Y.K., Eckdahl, S., Stalboerger, P.G., Jenkins, R.B. and Kaufmann, S.H.:** Characterization of an Ovarian Carcinoma Cell Line Resistant to Cisplatin and Flavopiridol. *Clinical Cancer Research* Vol. 6, S. 661-670 (2000).
- (12) **Bible, K.C., Kaufman, S.H.:** Cytotoxic synergy between Flavopiridol (NSC 649 890, L86-2875) and various antineoplastic agents: the importance of sequence of administration. *Cancer Res* 57: S. 3375–80 (1997).
- (13) **Bible, K.C., Kaufmann, S.H.:** Flavopiridol: a cytotoxic flavone that induces cell death in noncycling A549 human lung carcinoma cells. *Cancer Res.* 56(21): S. 4856-61 (1996).
- (14) **Bible, K.C., Lensing, J.L., Nelson, S.A., Lee, Y.K., Reid, J.M., Ames, M.M., Isham, C.R., Piens, J., Rubin, S.L., Rubin, J., Kaufmann, S.H., Atherton, P.J., Sloan, J.A., Daiss, M.K., Adjei, A.A., Erlichman, C.:** Phase 1 trial of flavopiridol combined with cisplatin or carboplatin in patients with advanced malignancies with the assessment of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points. *Clin Cancer Res.* 11(16): S. 5935-41 (2005).
- (15) **Bijman, M.N., Hermelink, C.A., van Berkel, M.P., Laan, A.C., Janmaat, M.L., Peters, G.J., Boven, E.:** Interaction between celecoxib and docetaxel or cisplatin in human cell lines of ovarian cancer and colon cancer is independent of COX-2 expression levels. *Biochem Pharmacol.* 75(2), S. 427-37 (2008).
- (16) **Blagosklonny, M.V.:** Flavopiridol, an Inhibitor of Transcription. *Cell Cycle* 3:12, S. 1537-1542 (2004)
- (17) **Boolbol, S.K., Dannenberg, A.J., Chadburn, A., Martucci, C., Guo, X.J., Ramonetti, J.T. et al.:** Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 56:2556–60 (1996).
- (18) **Botting, R.M.:** Inhibitors of cyclooxygenases: Mechanisms, Selectivity and Uses. *Journal of Physiology and Pharmacology* 57, Supp 5, S. 113-124 (2006).
- (19) **Buckstein, R., Kerbel, R.S., Shaked, Y., Nayar, R., Foden, C., Turner, R., Lee, C.R., Taylor, D., Zhang, L., Man, S., Baruchel, S., Stempak, D., Bertolini F., Crump, M.:** High-Dose celecoxib and metronomic "low-dose" cyclophosphamide is an effective and safe therapy in patients with relapsed and refractory aggressive histology non-Hodgkins lymphoma. *Clin Cancer Res* 12 (17) 5190-8 (2006).
- (20) **Bundesvereinigung, Kassenärztliche.** Bekanntmachungen: Therapiehinweis nach Nr. 14 der Arzneimittelrichtlinien Celecoxib. *Dtsch Arzteblatt* (46): A-3050 / B-2530 / C-2366, S. 100 (2003).

- (21) **Burghard, E., Girardi, F., Lahousen, M., Tamussino, K., Stettner, H.:** Patterns of pelvic and paraortic lymph node involvement in ovarian cancer. *Bd. Gynecol Oncol* 40: 103-6 (1991).
- (22) **Byrd, J.C., Lin Thomas, S., Dalton, J.T., Di Wu, Phelps, M.A., Fischer, M.M., Blum K.A., Rovin B., Brooker-McEldowney M., Broering S., Schaaf L.J., Johnson A.J., Lucas D.M., Heerema N.A., Lozanski G.:** Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 109(2): 399–404 (2007).
- (23) **Byrd, J.C., Peterson, B.L., Gabrilove, J., Odenike, O.M., Grever, M.R., Rai, K., Larson, R.A. and the Cancer and Leukemia Group B.:** Treatment of Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia by 72-Hour Continuous Infusion or 1-Hour Bolus Infusion of Flavopiridol: Results from Cancer and Leukemia Group B Study 19805. *Clin Cancer Research* 11: S. 4176 (2005).
- (24) **Carlson, B., Lahusen, T., Singh, S. et al:** Downregulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res* 59, S. 4634-4641 (1999).
- (25) **Carlson, B.A., Dubay, M.M., Sausville, E.A., Brizuela, L., Worland, P.J.:** Flavopiridol Induces G₁ Arrest with Inhibition of Cyclin-dependent Kinase (CDK) 2 and CDK4 in Human Breast Carcinoma Cells. *CANCER RESEARCH* 56, S. 2973-2978 (1996).
- (26) **Castellone, M.D., Teramoto, H., Williams, B.O., Druey, K.M., Gutkind, J.S.:** Prostaglandin E₂ promotes colon cancer cell growth through a Gsaxin-b-catenin signaling axis. *Science*, 310:1504–10 (2005).
- (27) **Catalano, A., Graciotti, L., Rinaldi, L., Raffaelli, G., Rodilossi, S., Betta, P. et al.:** Preclinical evaluation of the nonsteroidal anti-inflammatory agent celecoxib on malignant mesothelioma chemoprevention. *Int J Cancer* 109: S. 322 – 8 (2004).
- (28) **Chao, S.H., Price, D.H.:** Flavopiridol inactivates p-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem* 276: S. 31793–9 (2001).
- (29) **Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tsichlis, P.N., Testa, J.R.:** AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(19): S. 9267-71 (1992).
- (30) **Colevas, D., Blaylock, B., Gravell, A.:** Current clinical trials of flavopiridol. *Oncology* 16: S. 1204-1214 (2002).
- (31) **Dai, Y. and Grant, S.:** Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* 3: S. 362–370 (2003).

- (32) **Daikoku, T., Wang, D., Tranguch, S., Morrow, J.D., Orsulic, S., DuBois, R.N., Dey, S.K.:** Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Res.* 65(9): S. 3735-44 (2005).
- (33) **Dannenberger, A.J., Lippman, S.M., Mann, J.R., Subbaramaiah, K., DuBois, R.N.:** Cyclooxygenases and Lipooxygenases in Carcinogenesis 2253: Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol.*, S. 23254–66 (2005).
- (34) **De Azevedo, W.F., Mueller-Dieckmann, H.J., Schulze-Gahmen, U., Worland, P.J., Sausville, E., Kim, S.H.:** Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2735 (1996).
- (35) **De Gunzburg, J.:** Proteins of the Ras pathway as novel potential anticancer therapeutic targets. *Cell Biology and Toxicology* 15: S. 345-358 (1999).
- (36) **Denkert, C., Fürstenberg, A., Daniel, P.T., Koch, I., Köbel, M., Weichert, W., Siegert, A., Hauptmann, S.:** Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drugs NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference. *Oncogene*, 27;22(54): S. 8653-61 (2003).
- (37) **Denkert, C., Köbel, M., Pest, S., Koch, I., Berger, S., Schwabe, M., Siegert, A., Reles, A., Klosterhalfen, B., Hauptmann, S.:** Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 160(3): S. 893-903 (2002).
- (38) **Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P.:** The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 18;100(4): S. 387-90 (2000)
- (39) **Eberdisse, Eckard:** Pharmakologie und Toxikologie. (Springerverlag, Berlin, Heidelberg, Marburg 2001).
- (40) **Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., DuBois, R.N.:** Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, S. 107:1183–8 (1994).
- (41) **El-Rayes, B.F., Gadgeel, S., Parchment, R., Lorusso, P., Philip, P.A.:** A phase I study of flavopiridol and docetaxel. *Invest New Drugs* 24(4): S. 305-10 (2006).
- (42) **Erkinheimo, T.L., Lassus, H. and Finne, P. et al.:** Elevated cyclooxygenase-2 expression is associated with altered expression of p53 and SMAD4, amplification of HER-2/neu, and poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, S. 538–545 (2004).
- (43) **Fabi, A., Metro, G., Papaldo, P., Mottolese, M., Melucci, E., Carlini, P., Sperduti, I., Russillo, M., Gelibter, A., Ferretti, G., Tomao, S., Milella, M., Cognetti, F.:** Impact of celecoxib on capecitabine tolerability and activity in pretreated metastatic

- breast cancer: results of a phase II study with biomarker evaluation. *Cancer Chemother Pharmacol* 62(4):717-25 (2008).
- (44) **Ferrandina, G., Ranelletti, F.O. and Legge F. et al.: Prognostic role of the ratio between cyclooxygenase-2 in tumor and stroma compartments in cervical cancer.** *Clin Cancer Res* 10, S. 3117–3123 (2004).
 - (45) **Forbes online magazine:** <http://www.forbes.com/2001/08/22/0822cox.html>. Forbes-Magazin online. <http://www.forbes.com/2001/08/22/0822cox.html>. Accessed in April 2008.
 - (46) **Fornier, M.N., Rathkopf, D., Shah, M., Patil, S., O'Reilly, E., Tse, A.N., Hudis, C., Lefkowitz, R., Kelsen, D.P., Schwartz, G.K.:** Phase I dose-finding study of weekly docetaxel followed by flavopiridol for patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 13(19). S. 5841-6 (2007).
 - (47) **Fürstenberger, G., Krieg, P., Müller-Decker, K. and Habenicht, A.J.R.: MINI REVIEW Research Group Eicosanoids and Tumor Development, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg** What are cyclooxygenases and lipoxigenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *Int J Cancer* 15;119(10):2247-54 (2006).
 - (48) **Funkhouser, E.M., Sharp, G.B.:** Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer* 1;76(7):1116-9 (1995).
 - (49) **Giovannucci, E., Egan, K.M., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C. et al.:** Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med.* 333:609–14 (1995).
 - (50) **Grendys, E.C. Jr., Blessing, J.A., Burger, R., Hoffman, J.:** A phase II evaluation of flavopiridol as second-line chemotherapy of endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 98(2): S. 249-53 (2005).
 - (51) **Grösch, S., Tegeder, I., Niederberger, E., Bräutigam, L., Geisslinger, G.:** COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 15. S. 2742 – 4 (2001).
 - (52) **Grösch, S., Maier, T.J., Schiffmann, S. , Geisslinger, G.:** Cyclooxygenase-2 (COX-2) – Independent Anticarcinogenic Effects of Selective COX-2 Inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 98, No. 11 (2006).
 - (53) **Gubbay, O., Guo, W., Rae, M.T., Niven, D., Langdon, S.P., Hillier, S.G.:** Inflammation-associated gene expression is altered between normal human ovarian surface epithelial cells and cell lines derived from ovarian adenocarcinomas. *Br J Cancer* 23;92(10): S. 1927-33 (2005).
 - (54) **Gupta, R.A., Tejada, L.V., Tong, B.J., Das, S.K., Morrow, J.D., Dey, S.K., DuBois, R.N.:** Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res.* 63(5): S. 906-11 (2003).

- (55) **Hata, A.N., Breyer, R.M.:** Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 103:147–66 (2004).
- (56) **Helliwell, R.J., Adams, L.F., Mitchell, M.D.:** Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70: S. 101-13 (2004).
- (57) **Honoki, K., Yoshitani, K., Tsujiuchi, T., Mori, T., Tsutsumi, M., Morishita, T., Takakura, Y., Mii, Y.:** Growth inhibition and induction of apoptosis by flavopiridol in rat lung adenocarcinoma, osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma cell lines. *Oncol Rep.* 11(5): S. 1025-30 (2004).
- (58) **Hsu, A.L., Ching, T.T., Wang, D.S., Song, X., Rangnekar, V.M., Chen, C.S.:** The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 275, S. 11397–11403 (2000).
- (59) **http://web.chemistry.gatech.edu/~williams/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html** . Accessed in February 2008.
- (60) **Johnson, A.J., Hsu, A.L., Lin, H.P., Song, X., Chen, C.S.:** The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. *Biochem J* 366: S. 831 (2002).
- (61) **Jonker, Daniël M., Sandra, A.G., Visser, Piet H., van der Graaf, Rob. A., Voskuyl and Meindert Danhof:** Towards a mechanism-based analysis of pharmacodynamic drug–drug interactions in vivo. *Pharmacology & Therapeutics*. Volume 106, Issue 1, S. 1-18 (2005).
- (62) **Jung, C.P., Motwani, M.V., Schwartz, G.K.:** Flavopiridol increases sensitization to gemcitabine in human gastrointestinal cancer cell lines and correlates with down-regulation of ribonucleotide reductase M2 subunit. *Clin Cancer Res.* 7(8): S. 2527-36 (2001).
- (63) **Kardosh, A., Blumenthal, M., Wang, W.J., Chen, T.C., Schönthal, A.H.:** . Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Cancer Biol Ther* 3(1): S. 55-62 (2004).
- (64) **Karp, J.E., Smith, B.D., Levis, M.J., Gore, S.D., Greer, J., Hattenburg, C., Briel, J., Jones, R.J., Wright, J.J., Colevas, A.D.:** Sequential flavopiridol, cytosine arabinoside, and mitoxantrone: a phase II trial in adults with poor-risk acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 1;13(15Pt1). S. 4467-73 (2007).
- (65) **Kern, M.A., Schubert, D., Sahi, D., Schoneweiss, M.M., Moll, I., Haugg, A.M. et al.:** Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Hepatology* 36 (4 Pt 1): S. 885 – 94 (2002).

- (66) **Kim, D.M., Koo, S.Y., Jeon, K. et al:** Rapid induction of apoptosis by combination of flavopiridol and tumor necrosis factor (TNF)-alpha or TNF-related apoptosis-inducing ligand in human cancer cell lines. *Cancer Res* 63, S. 621-626 (2003).
- (67) **Kim, S.H., Song, S.H., Kim, S.G., Chun, K.S., Lim, S.Y., Na, H.K. et al.:** Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol* 130 : S. 551 – 60 (2004).
- (68) **Knudsen, J.F., Carlsson, U., Hammarstrom, P., Sokol, G.H., Cantilena, L.R.:** The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent inhibitor of human carbonic anhydrase II. *Inflammation* 28, S. 285-288 (2004).
- (69) **König, A., Schwartz, G.K., Mohammad, R.M., Al-Katib, A. and Gabrilove, J.L.:** The Novel Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol Downregulates Bcl-2 and Induces Growth Arrest and Apoptosis in Chronic B-Cell Leukemia Lines. *Blood* 90, S. 4307-4312 (1997).
- (70) **Kouroukis, C.T., Belch, A., Crump, M., Eisenhauer, E., Gascoyne, R.D., Meyer, R., Lohmann, R., Lopez, P., Powers, J., Turner, R., Connors, J.M. und Group National Cancer Institute of Canada Clinical Trials:** Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 1;21(9): S. 1740-5 (2003).
- (71) **Kulp, S.K., Yang, Y.T., Hung, C.C., Chen, K.F., Lai, J.P., Tseng, P.H., Fowble J.W., Ward, P.J., Chen, C.S.:** 1 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, S. 1444 (2004).
- (72) **Kurose, K., Zhou, X.P., Araki, T., Cannistra, S.A., Maher, E.R., Eng, C.:** Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *Am J Pathol.* 158(6): S. 2097-106 (2001).
- (73) **Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K. et al.:** Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384: 644-648 (1996).
- (74) **Kyung-Soo Chun, Young-Joon Surh:** Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochemical Pharmacology* 68, S. 1089–1100 (2004).
- (75) **Lam, L.T., Pickeral, O.K., Peng, A.C. et al.:** Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* 2: S. 0041.1–11 (2001).

- (76) **Lee, H.C., Park, I.C., Park, M.J., An, S., Woo, S.H., Jin, H.O. et al:** Sulindac and its metabolites inhibit invasion of glioblastoma cells via down-regulation of Akt/PKB and MMP-2. *J Cell Biochem* 94 : S. 597 – 610 (2005).
- (77) **Lefkowitz, J.B.:** Cyclooxygenase-2-Specificity and its clinical implications. *Am J Med.* 31;106(5B):43-50 (1999).
- (78) **Leng, J., Han, C., Demetris, A.J., Michalopoulos, G.K., Wu, T.:** Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* 38(3): S. 756-68 (2003).
- (79) **Li, G., Yang, T, Yan J.:** Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 299: S. 886-90 (2002).
- (80) **Li, S., Miner, K., Fannin, R., Carl Barrett, J., Davis, B.J.:** Cyclooxygenase-1 and 2 in normal and malignant human ovarian epithelium. *Gynecol Oncol.* 92(2): S. 622-7 (2004).
- (81) **Li, Y., Bhuiyan, M., Alhasan, S., Senderowicz, A.M., Sarkar, F.H.:** Induction of apoptosis and inhibition of c-erbB-2 in breast cancer cells by flavopiridol. *Clin Cancer Res.* 6(1): S. 223-9 (2000).
- (82) **Lin, H.P., Kulp, S.K., Tseng, P.H., Yang, Y.T., Yang, C.C., Chen, C.S.:** Growth inhibitory effects of celecoxib in human umbilical vein endothelial cells are mediated through G1 arrest via multiple signaling mechanisms. *Mol Cancer Ther* 3: S. 1671 – 80 (2004).
- (83) **Lin, M.T., Lee, R.C., Yang, P.C., Ho, F.M., Kuo, M.L.:** Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 276 : S. 48997 – 9002 (2001).
- (84) **Liu, A.X., Testa, J.R., Hamilton, T.C., Jove, R., Nicosia, S.V., Cheng, J.Q.:** AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-HA-ras, and v-SRC through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 15;58(14). S. 2973-7 (1998).
- (85) **Liu, G., Gandara, D.R., Lara, P.N. Jr., Raghavan, D., Doroshow, J.H., Twardowski, P., Kantoff, P., Oh, W., Kim, K., Wilding, G.:** A Phase II trial of flavopiridol (NSC #649890) in patients with previously untreated metastatic androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.*1;10(3). S. 924-8 (2004).
- (86) **Long, X., Müller, F., Avruch, J.:** Tor action in mammalian cells and in *caenorhabditis elegans*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 279: S. 115-38 (2004).
- (87) **Lü, X., Burgan, W.E., Cerra, M.A., Chuang, E.Y., Tsai, M.H., Tofilon, P.J., Camphausen, K.:** Transcriptional signature of flavopiridol-induced tumor cell death. *Mol Cancer Ther.* 3(7): S. 861-72 (2004).

- (88) **Luo Cheng, He Ming-liang and Bohlin, Lars:** Is COX-2 a perpetrator or a protector? Selective COX-2 inhibitors remain controversial. Review. *Acta Pharmacologica Sinica* 26 (8): 926–933 (2005).
- (89) **Maier, T.J., Janssen, A., Schmidt, R., Geisslinger, G., Grosch, S.:** Targeting the beta-catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J* 19 : S. 1353-5 (2005).
- (90) **Makhija, S., Husain, A., Schwartz, G.K., Spriggs, D.R.:** Cytotoxicity of Flavopiridol in ovarian cancer cells, alone and in combination with CDDP. *Proc Am Assoc Cancer Res* 38:320 (1997).
- (91) **Malumbres, M., Pevarello, P., Barbacid, M. and Bischoff, J.R.:** CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol Sci.* 29(1):16-21 (2008).
- (92) **Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D. et al:** Mammalian cells cycle without the D-type cyclindependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118: S. 493-504 (2004).
- (93) **Martin, K.A., Blenis, J.:** Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. *Adv Cancer Res.* 86: S. 1-39 (2002).
- (94) **Mason, K.A. M.S., Hunter N.R., M.S., Raju U., Ph.D., Ariga H., M.D., Ph.D., Husain A., M.D., Valdecanas D., B.S. et al.:** Flavopiridol increases therapeutic ratio of radiotherapy by preferentially enhancing tumor radioresponse. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 59, No. 4, S. 1181-1189 (2004).
- (95) **Matranga, C.B., Shapiro, G.I.:** Selective sensitization of transformed cells to flavopiridol-induced apoptosis following recruitment to S-phase. *Cancer Res* 62: S. 1707-1717 (2002).
- (96) **Mayer, F., Mueller, S., Malenke, E., Kuczyk, M., Hartmann, J.T. and Bokemeyer, C.:** Induction of apoptosis by flavopiridol unrelated to cell cycle arrest in germ cell tumour derived cell lines. *Investigational New Drugs* 23 (3): S. 205–211 (2005).
- (97) **Melillo, G., Sausville, E.A., Cloud, K. et al:** Flavopiridol, a protein kinase inhibitor, down-regulates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor expression in human monocytes. *Cancer Res* 59: S. 5433-5437 (1999).
- (98) **Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.L. et al.:** A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* 11: S. 2909-17 (1992)
- (99) **Morice, P., Joulie, F., Cammate, S., Atallah, D., Rouzier, R., Pautier, P., Pomel, C., Duvillard, P., Castaigne, D.:** Lymph Node involvement in epithelial ovarian cancer: analysis of 276 pelvic and paraaortic lymphadenectomies and surgical implications. *J Am Coll Surg*, Bde. 197:198-205 (2003).

- (100) **Motwani, M., Delohery, T.M., Schwartz, G.K.:** Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 5(7): S. 1876-83 (1999).
- (101) **Motwani, M., Jung, C., Sirotnak, F.M., She, Y., Shah, M.A., Gonen, M., Schwartz G.K.:** Augmentation of apoptosis and tumor regression by flavopiridol in the presence of CPT-11 in Hct116 colon cancer monolayers and xenografts. *Clin Cancer Res.*7(12): S. 4209-19 (2007).
- (102) **Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tschlis, P.N., Rosen, N.:** Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem.* 6;273(45): S. 29864-72 (1998).
- (103) **Munkarah, A.R., Morris. R., Baumannk, P., Deppe, G., Malone, J., Diamond, M.P., Saed, G.M.:** Effects of prostaglandin E(2) on proliferation and apoptosis of epithelial ovarian cancer cells. *J Soc Gynecol Investig* 9(3): S. 168-73 (2002).
- (104) **Nam, D.H., Park, K., Park, C., Im, Y.H., Kim, M.H., Lee, S., et al.:** Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Oncol Rep* 11 : S. 263 – 8 (2004).
- (105) **Narayanan, B.A., Condon, M.S., Bosland, M.C., Narayanan, N.K., Reddy, B.S.:** Suppression of N-methyl-N-nitrosourea/testosterone-induced rat prostate cancer growth by celecoxib: effects on cyclooxygenase-2, cell cycle regulation, and apoptosis mechanisms. *Clin Cancer Res* 15; 9(9): S. 3503 – 13 (2003).
- (106) **Newcomb, E.W.:** Flavopiridol : pleiotropic biological effects enhance its anti-cancer activity. Review. *Anticancer Drugs*, 15(5): S. 411-9 (2004).
- (107) **Niederberger, E., Tegeder, I., Vetter, G., Schmidtko, A., Schmidt, H., Euchenhofer, C. et al.:** Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *FASEB J* 15 : S. 1622 – 4 (2001).
- (108) **Norel, X., Brink, C.:** The quest for new cysteinyl-leukotriene and lipoxin receptors: recent clues. [Journal] // *Pharmacol Ther* 103:81–94 (2004).
- (109) **Pastorekova, S., Kopacek, J., Pastorek, J.:** Carbonic anhydrase inhibitors and the management of cancer. *Curr Top Med Chem* 7(9): 865–878 (2007).
- (110) **Patel, M.I., Subbaramaiah, K., Du, B., Chang, M., Yang, P., Newman, R.A., et al.** Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res* 1;11(5):1999 – 2007 (2005).
- (111) **Peluffo, G.D., Stillitani, I., Rodriguez, V.A., Diamant, M.J., Klein, S.M.:** Reduction of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in murine lung adenocarcinoma by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Int J Cancer* 110, S. 825 – 30 (2004).

- (112) **Pines, J.:** Cyclins:Wheels within wheels. *Cell Growth Differ* 2, S. 305-310 (1991).
- (113) **Pumfery, A., de la Fuente, C., Berro, R., Nekhai, S., Kashanchi, F., Chao, S.H.:** Potential use of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors as anti-HIV therapeutics. *Curr Pharm Des* 12(16): S. 1949-61 (2006)-
- (114) **Pyrko, P., Kardosh, A., Liu, Y.T., Soriano, N., Xiong, W., Chow, R.H., Uddin, J., Petasis, N.A., Mircheff, A.K., Farley, R.A., Louie. S.G., Chen, T.C., Schönthal, A.H.:** Calcium-activated ER stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib (DMC), a non-coxib analog of celecoxib. *Mol Cancer Ther* 6: 1262–1275 (2007).
- (115) **Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U.R., Albert, S.:** Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta.* 1773(8): 1177-95 (2007).
- (116) **Raju, U., Nakata, E., Mason, K.A., Kian, Ang K. and Milas, L.:** Flavopiridol, a Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, Enhances Radiosensitivity of Ovarian Carcinoma Cells. *Cancer Research* 63, S. 3263–3267 (2003).
- (117) **Raspollini, M.R., Amunni, G., Villanucci, A., Boddi, V., Taddei, G.L.:** Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) and P-glycoprotein-170 (MDR1) expression is associated with chemotherapy resistance and poor prognosis. Analysis in ovarian carcinoma patients with low and high survival. *Int J Gynecol Cancer* 15(2): S. 255-60 (2005).
- (118) **Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H., Lees, E.:** Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene* 12: 2631 (1996).
- (119) **Rigas, B., Goldman, I.S., Levine, L.:** Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 122:518–23 (1993).
- (120) **Ristimäki, A., Sivula, A., and Lundin, J. et al.:** Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62, S. 632–635 (2002).
- (121) **Robert-Koch-Institut:** Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. Aus der Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2004).
- (122) **Robert-Koch-Institut und Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregisters (GEKID):** Krebs in Deutschland. 7. Ausgabe: Ausgewählte Einzellokalisationen aus dem Beitrag der zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes Krebs in Deutschland 2005/2006 (2006).
- (123) **Rodríguez-Burford, C., Barnes, M.N., Oelschlager, D.K., Myers, R.B., Talley, L.I., Partridge, E.E., Grizzle, W.E.:** Effects of nonsteroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) on ovarian carcinoma cell lines: preclinical evaluation of NSAIDs as chemopreventive agents. *Clin Cancer res* 8(1): S. 202-9 (2002).
- (124) **Rudek, M.A., Bauer, K.S.Jr., Lush, R.M. 3rd et al:** Clinical pharmacology of flavopiridol following a 72- hour continuous infusion. *Ann Pharmacother* 37: 1369-1374 (2003).

- (125) **Ruvolo, P.P.:** Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 47: 383 – 92 (2003).
- (126) **Saucier, J.M., Yu, J., Gaikwad, A., Coleman, R.L., Wolf, J.K., Smith, J.A.:** Determination of the optimal combination chemotherapy regimen for treatment of platinum-resistant ovarian cancer in nude mouse model. *J Oncol Pharm Pract* 13(1): S. 39-45 (2007).
- (127) **Sausville, E.A.:** Cell Cycle Regulatory Kinase Modulators: Interim Progress and Issues. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5(12):1 S. 1109-1117 (2005).
- (128) **Sausville, E.A.:** Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends Mol Med* 8, S. 32–7 (2002).
- (129) **Scharf, A., Günter, H.H., Sohn, C.:** Screening auf Ovarialkarzinom. *Gynäkologe* 35:537-547 (2002).
- (130) **Schöndorf, T., Göhring, U.J., Roth, G., Middel, I., Becker, M., Moser, N., Valter, M.M., Hoopmann, M.:** Time to progression is dependent on the expression of the tumour suppressor PTEN in ovarian cancer patients. *Eur J Clin Invest* 33(3): S. 256-60 (2003).
- (131) **Schönthal, A. H.:** Direct non-cyclooxygenase-2 targets of celecoxib and their potential relevance for cancer therapy, Minireview. *British Journal of Cancer* 97, 1465-1468 (2007).
- (132) **Schwartz, G.K., Farsi, K., Daso, D. et al:** The protein kinase C (PKC) inhibitors UCN-01 and Flavopiridol (FLAVO) significantly enhance the cytotoxic effect of chemotherapy by promoting apoptosis in gastric and breast cancer cells. *Proc AmSoc Oncol* 15:501 (1996).
- (133) **Schwartz, G.K., Ilson, D., Saltz, L., O'Reilly, E., Tong, W., Maslak, P., Werner, J., Perkins, P., Stoltz, M., Kelsen, D.:** Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1;19(7): S. 1985-92 (2001).
- (134) **Schwartz, G.K., O'Reilly, E., Ilson, D., Saltz, L., Sharma, S., Tong, W., Maslak, P., Stoltz, M., Eden, L., Perkins, P., Endres, S., Barazzoul, J., Spriggs, D., Kelsen D.:** Phase I study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in combination with paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 15;20(8): S. 2157-70 (2002).
- (135) **Sedlacek, H.H., Czech, J., Naik, R. et al:** Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *Int J Oncol* 9: 11143-1168 (1996).
- (136) **Sedlacek, H.H.:** Mechanisms of action of flavopiridol. *Cri Rev Oncol Hematol* 38: S. 139-170 (2001).

- (137) **Senderowics, A.M.:** Novel direct and indirect cyclin-dependent kinase modulators for the prevention and treatment of human neoplasms. *Cancer Chemother Pharamcol* 52 (Suppl 1): S. 61-73 (2003).
- (138) **Senderowicz, A.M.:** Novel small-molecule cyclin-dependent kinase modulators in human clinical trials. *Cancer Biology & Therapy*, 2(4:Suppl): S. 84-95 (2003).
- (139) **Senderowicz, A.M.:** Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene* 22: S. 6609-6620 (2003).
- (140) **Senderowicz, A.M.:** The cell cycle as a target for cancer therapy: basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01. *Oncologists* 7: S. 12-19 (2002).
- (141) **Senderowicz, A.M., Headlee, D., Stinson, S.F., Lush, R.M., Kalil, N., Villalba, L., Hill, K., Steinberg, S.M., Figg, W.D., Tompkins, A., Arbuck, S.G., Sausville, E.A.:** Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol* 16(9). S. 2986-99 (1998).
- (142) **Shah, M.A., Kortmansky, J., Motwani, M., Drobnjak, M., Gonen, M., Yi, S., Weyerbacher, A., Cordon-Cardo, C., Lefkowitz, R., Brenner, B., O'Reilly, E., Saltz, L., Tong, W., Kelsen, D.P., Schwartz, G.K.:** A phase I clinical trial of the sequential combination of irinotecan followed by flavopiridol. *Clin Cancer Res*. 15;11(10): S. 3836-45 (2005).
- (143) **Shapiro, G. I.:** Preclinical and Clinical Development of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol. *Clinical Cancer Research* 15;10(12Pt 2): S. 4270–4275 (2004).
- (144) **Shapiro, G.I.:** Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment. *J Clin Oncol* 24 (11): S. 1770-1783 (2006).
- (145) **Shapiro, G.I., Koestner, D.A., Matranga, C.B. and Rollins, B.J.:** Flavopiridol Induces Cell Cycle Arrest and p53-independent Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Clinical Cancer Research* Vol. 5, S. 2925–2938 (1999).
- (146) **Shapiro, G.I., Supko, J.G., Patterson, A., Lynch, C., Lucca, J., Zaccarola, P.F., Muzikansky, A., Wright, J.J., Lynch, T.J. Jr, Rollins, B.J.:** A phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in patients with previously untreated stage IV non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 7(6). S. 1590-9 (2001).
- (147) **Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocci, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., Gray, J.W.:** PIK3Ca is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 21(1): S. 99-102 (1999).
- (148) **Sherr, C.J.:** Cancer cell cycles. *Science* 274: S. 1672 (1996).
- (149) **Sherr, C.J., Roberts, J.M.:** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: S. 1501–12 (1999).

- (150) **Sherr, C.J., Roberts, J.M.:** Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9: S. 1149–63 (1995).
- (151) **Sherr, C.J.:** G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* 79, S. 551-555 (1994).
- (152) **Shinn, C., Larsen, D., Suarez, J.R.:** Flavopiridol sensitivity of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells in vitro varies based upon species specific drug protein binding. *Blood* 96:294b (2000).
- (153) **Song, Y., Shen, K., Tang, P.P.:** Therapeutic effect of flavopiridol, a small molecular cyclin-dependent kinase inhibitor, in human ovarian carcinoma. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 42(11): S. 761-4 (2007)
- (154) **Song, Y.C., Kim, S.H., Juhnn, Y.S., Song, Y.S.:** Apoptotic effect of celecoxib dependent upon p53 status in human ovarian cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 1095: 26-34 (2007).
- (155) **Soumaoro, L.T., Uetake, H., Higuchi T., Takagi Y., Enomoto M. and Sugihara K.:** Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10, S. 8465–8471 (2004).
- (156) **Stadler, W.M., Vogelzang, N.J., Amato, R., Sosman, J., Taber, D., Liebowitz, D., Vokes, E.E.:** Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in metastatic renal cancer: a University of Chicago Phase II Consortium study. *J Clin Oncol.* 18(2): S. 371-5 (2000).
- (157) **Steinbild, S., Arends, J., Medinger, M., Häring, B., Frost, A., Drevs, J., Unger, C., Strecker, R., Hennig, J., Mross, K.:** Metronomic antiangiogenic therapy with capecitabine and celecoxib in advanced tumor patients-results of a phase II study. *Onkologie* 30(12): S. 629-35 (2007).
- (158) **Sun, M., Wang, G., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z.Q., Ma, X.L., Shelley, S.A., Jove, R., Tschlis, P.N., Nicosia, S.V., Cheng, J.Q.:** AKT1/PKB-alpha-kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 159(2): S. 431-7 (2001).
- (159) **Symowicz, J., Adley, B.P., Woo, M.M.M., Auersperg, N., Hudson, L.G. and Stack, M.S.:** Cyclooxygenase-2 Functions as a Downstream Mediator of Lysophosphatidic Acid to Promote Aggressive Behavior in Ovarian Carcinoma Cells. *Cancer Research* 65, S. 2234-2242 (2005).
- (160) **Takada, Y., Aggarwal. B.B.:** Flavopiridol inhibits NF-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory agents through inhibition of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclin D1, cyclooxygenase-2, and matrix metalloprotease-9. *J Biol Chem* 279(6). S. 4750-9 (2004).
- (161) **Tallarida, Ronald J.:** The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain* 98, S. 163-168 (2002).

- (162) **Tan, A.R., Headlee, D., Messmann, R., Sausville, E.A., Arbuck, S.G., Murgo, A.J., Melillo, G., Zha, S., Figg, W.D., Swain, S.M., Senderowicz, A.M.:** Phase I clinical and pharmacokinetic study of flavopiridol administered as a daily 1-hour infusion in patients with advanced neoplasms. *J Clin Oncol* 1;20(19). S. 4074-82 (2002).
- (163) **Tan, A.R., Yang, X., Berman, A., Zhai, S., Sparreboom, A., Parr, A.L., Chow, C., Brahim, J.S., Steinberg, S.M., Figg, W.D., Swain, S.M.:** Phase I trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in combination with docetaxel in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 1;10(15). - 2004. - S. 5038-47 (2004).
- (164) **Tanaka, K., Tomisato, W., Hoshino, T., Ishihara, T., Namba, T., Aburaya, M., Katsu, T., Suzuki, K., Tsutsumi, S., Mizushima, T.:** Involvement of intracellular Ca²⁺ levels in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 280(35):31059-67 (2005).
- (165) **Tavassoli, F.A., Devilee, P.:** World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon : IARC Press (2003).
- (166) **Testa, J.R., Bellacosa, A.:** AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25;98(20):S. 10983-5 (2001).
- (167) **Tetsu, O., McCormick, F.:** Proliferation of cancer cells despite cdk2 inhibition. *Cancer Cell* 3: S. 233- 245 (2003).
- (168) **Trimbos, J.B., Vergote, I., Bolis, G. , Vermorken, J.B., Mangioni, C., Madronal, C., Franchi, M., Tateo, S., Zanetta, G., Scarfone, G., Giurgea, L., Timmers, P., Coens, C., Pecorelli, S.:** Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in ovarian Neoplasm trial. *Bde. J Natl Cancer Inst* 95:113-25 (2003).
- (169) **Tsujii, M., Kawano, S., DuBois, R.N.:** Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3336–40 (1997).
- (170) **Van Veldhuizen, P.J., Faulkner, J.R., Lara, P.N. Jnr., Gumerlock, P.H., Goodwin, J.W., Dakhil, S.R., Gross, H.M., Flanigan, R.C., Crawford, E.D. und Group Southwest Oncology:** A phase II study of flavopiridol in patients with advanced renal cell carcinoma: results of Southwest Oncology Group Trial 0109. *Cancer Chemother Pharmacol* 56(1). S. 39-45 (2005).
- (171) **Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N.:** The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36. S. 131–149 (2003).

- (172) **Vital-Reyes, V., Rodríguez-Burford, C., Chhieng, D.C., Oelschlager, D.K., Reyes-Fuentes, A., Barnes, M., Grizzle, W.E.:** Celecoxib inhibits cellular growth, decreases Ki-67 expression and modifies apoptosis in ovarian cancer cell lines. *Arch Med Res* 37(6): S. 689-95 (2006).
- (173) **Wall, N.R., O'Connor, D.S., Plescia, J., Pommier, Y., Altieri, D.C.:** Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Research* 1;63(1): S. 230-5 (2003).
- (174) **Wang, D., Buchanan, F.G., Wang, H., Dey, S.K., DuBois, R.N.:** Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res* 65:1822–9 (2005).
- (175) **Wang, D., Dubois, R.N.:** Prostaglandins and cancer. *Gut* 55:115–22 (2006).
- (176) **Wang, H.J., Peng, Z.L., Liu, X.Q., Yang, K.X., Lou, J.Y., Luo, F.M.:** The growth inhibitory effect of non-steroid anti-inflammatory drugs on ovarian cancer. Abstract in English. Article in Chinese. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 38(3):428-32 (2007).
- (177) **Weber, A., Casini, A., Heine, A., Kuhn, D., Supuran, C.T., Scozzafava, A., Klebe, G.:** Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *J Med Chem* 47: S. 550–555 (2004).
- (178) **Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Channing, J. Der.:** The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 118, S. 843-846 (2005).
- (179) **West, K.A., Castillo, S.S., Dennis, P.A.:** Activation of the PI3K/AKT pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist. Updat.* 5(6): S. 234-48 (2002).
- (180) **Worland, P., Kaur, G., Stetler-Stevenson, M., et al.:** Alteration of the phosphorylation state of p34cdc2 kinase by the flavone L86-8275 in breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 46: S. 1831–40 (1993).
- (181) **Wu, G., Yi, J., Di, F., Zou, S., Li, X.:** Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via cyclooxygenase-2 pathway in human pancreatic carcinoma cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25(1): S. 42-4 (2005).
- (182) **Wu, T., Leng, J., Han, C., Demetris, A.J.:** The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 3(3): S. 299-307 (2004)
- (183) **Wulfing, C., Eltze, E., von Struensee, D., Wulfing, P., Hertle, L. and Piechota H.:** Cyclooxygenase-2 expression in bladder cancer: correlation with poor outcome after chemotherapy. *Eur Urol* 45, S. 46-52 (2004).
- (184) **Wun, T., McKnight, H., Tuscano, J.M.:** Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk Res* 28 : S. 179 – 90 (2004).

- (185) **Yu, C., Rahmani, M., Dai, Y., Conrad, D., Krystal, G., Dent, P., Grant, S.:** The lethal effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors in human leukemia cells proceed through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent process. *Cancer Res* 15;63(8). S. 1822-33 (2003).
- (186) **Yu, Q., Geng, Y., Sicinski, P.:** Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411: S. 1017-1021 (2001).
- (187) **Yuan, A., Yu, C.J. and Shun, C.T. et al.:** Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Int Journal Cancer* 115, S. 545–555 (2005).
- (188) **Yuan, Z.Q., Sun. M., Feldman, R.I., Wang, G., Ma, X., Jiang, C., Coppola, D., Nicosia, S.V., Cheng, J.Q.:** Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 4;19(19): S. 2324-30 (2000).
- (189) **Zhai, S., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Figg, W.D.:** Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in clinical development. *Ann Pharmacol* 36: S. 905-911 (2002).
- (190) **Zhang, Z., Lai, G.H., Sirica, A.E.:** Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* 39 : S. 1028 – 37 (2004).
- (191) **Zhu, G., Saed, G.M., Deppe, G., Diamond, M.P., Munkarah, A.R.:** Hypoxia up-regulates the effects of prostaglandin E2 on tumor angiogenesis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 94(2): S. 422-6 (2004).
- (192) **Zhu, J., Huang, J.W., Tseng, P.H., Yang, Y.T., Fowble, J., Shiau, C.W., Shaw, Y.J., Kulp, S.K., Chen, C.S.:** From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors. *Cancer Res* 64: S. 4309–4318 (2004).

7) Anhang

Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren

- In Marburg:

Arnold, Aumüller, Aziz, Bacher, Barth, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker,
 Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Bien, Brilla, Cetin, Czubayko,
 Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Effendy, Eisele, Elsässer,
 Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friederich, Fuhrmann, Geks, Gemsa, Geus, Golenhofen,
 Göke, Görg, Graul, Gress, Grimm, Griss, Grundner, Gudermann, Hackenberg, Hamer,
 Happle, Hadewig, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Heidenreich, Hellwig,
 Hemmer, Hering, Herrler, Hess, Herzum, Hilgermann, Hochban, Hörsch, Hofmann,
 Huffmann, Jacob, Jungclas, Kälble, Kaffarnik, Kann, Kern, Kleine, Klenk, Klingmüller,
 Klose, Klaus, Knoll, Koch, Köhler, Koolman, Kowalski, Krause, Kretschmer, Krieg,
 Kroh, Kroll, Kuhn, Kuni, Lammel, Lang, Lange, Lehmann, Legrum, Lengsfeld,
 Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Löffler, Lohoff, Lorenz, Ludwig, Lürs, Lütcke, Maier,
 Maisch, Mann, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath,
 Noll, Nüsing, Oertel, Pieper, Pfeiffer, Pohlen, Radsak, Rehder, Remschmidt, Renz,
 Richter, Roeper, Rosemann, Rosenow, Rothmund, Rupp, Schachtschabel, Schäfer,
 Schepelmann, Schiff, Schlegel, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel,
 Schneider, Schreiber, Schuermann, Schumacher, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz,
 Seyberth, Slenczka, Sommer, Stachniss, Steiniger, Stiletto, Stinner, Strempel, Sturm,
 Thomas, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weber, Weihe, Werner, Wesemann,
 Westermann, Wichert v., Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Zielke.

- In Spanien:

Farrés Coll

Danksagung

Ohne die großzügige Hilfe zahlreicher Menschen hätte ich diese Dissertation nicht verfassen können.

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bedanken bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Uwe Wagner, und meinem Betreuer, Herrn Dr. Klaus Baumann, der mir während der gesamten Zeit dieser Dissertation immer freundlich mit Rat und Tat zur Seite stand und mit dem sich die Zusammenarbeit sehr zuverlässig und komplikationslos gestaltete.

In diesem Zuge gilt auch mein ganz besonderer Dank allen Mitarbeitern des Zellkulturlabors in Marburg, die da wären Frau Dr. Silke Reinhartz, Frau Traute Plaum und Herr Achim Almeroth. Sie haben ganz wesentlichen Anteil am Gelingen der praktischen Anteile dieser Dissertation. Die nette Atmosphäre im Labor hat mich den ein oder anderen experimentellen Fehlversuch immer schnell vergessen lassen, und ich denke gerne zurück an diese Zeit.

Ein herzliches Dankeschön für alles geht an meinen Freund Marc Hidalgo Sarsanedas.

Ein großes Dankeschön verdienen ebenfalls meine besten Freunde und Kommilitonen Isabel Eggemann und Elmar Klusmeier, von deren Erfahrungen ich profitieren konnte. Außerdem danke ich ihnen sowie Christian Keil und Harald Curth für eine wunderschöne Studienzeit in Marburg.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken für die seit fast dreißig Jahren bestehende permanente Unterstützung. Dank Ihrer hatte ich das große Glück, frei von materiellen Sorgen studieren und promovieren zu können. Sie haben immer an mich geglaubt, mich immer motiviert, besonders als mir gegen Ende dieser Dissertation „die Puste ausging“.